

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE CIENCIES

TECNICAS DE INOCULACION DE ABETO DE DOUGLAS
(*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco) CON HONGOS
ECTOMICORRICICOS Y SU APLICACION EN REFORESTACION

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Biología.

AUTOR:

Xavier Parladé Izquierdo
Licenciado en Ciencias Biológicas

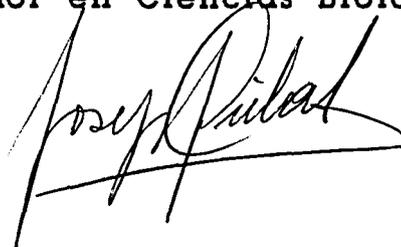


DIRECTORES DE TESIS:

Isabel Alvarez Fernández
Ph. D. en Plant Pathology



Josep Girbal i Lladó
Doctor en Ciencias Biológicas



LECTURA: Junio 1991

Isabel Alvarez Fernandez, en calidad de Jefe del Departamento de Patología Vegetal del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (I.R.T.A.), Centre de Cabrils.

CERTIFICA,

Que D. Xavier Parladé Izquierdo, licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha realizado en los laboratorios del Departamento de Patología Vegetal del I.R.T.A. el trabajo que, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, presenta con el título:

"Técnicas de inoculación de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco) con hongos ectomicorrícicos y su aplicación en reforestación"

y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Cabrils, a 12 de Mayo de 1992.



Fdo. Isabel Alvarez Fernández

Jefe del Departamento de Patología Vegetal

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de numerosas personas que, de uno u otro modo, han contribuido a su realización.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Isabel Alvarez, jefe del Departamento de Patología Vegetal del I.R.T.A. (Centre de Cabrils) y directora de la tesis, su confianza y apoyo, así como las numerosas sugerencias realizadas durante la realización de los ensayos y escritura de la memoria.

Al Dr. Josep Girbal del Dpto. de Biología Animal, Vegetal y Ecología de la Universitat Autònoma de Barcelona por la codirección de la tesis y sus enseñanzas en el campo de la Micología. Igualmente, agradezco al citado Departamento la aceptación de este trabajo.

Al Dr. Josep Tarragó, Director General del I.R.T.A. y al Dr. Joan-Juli Bonet, Director del Centre de Cabrils, por las facilidades ofrecidas para la realización de la tesis en el citado Instituto.

Al Dr. Enric Descals por su interés en mi trabajo y por hacerme partícipe de su experiencia en el campo de la Micología.

A todos los compañeros del Departamento de Patología Vegetal del I.R.T.A. por su apoyo y, particularmente, a Joan Pera por todo el trabajo conjunto realizado.

Al Dr. Jim Trappe, con quien tuve la suerte de convivir durante cuatro meses, por todas sus enseñanzas y a Randy Molina y Michael Castellano por su apoyo y su colaboración durante mi estancia en el Forestry Sciences Lab. en Corvallis (Oregon).

Al Dr. François Le Tacon del I.N.R.A. de Nancy, al Dr. Chris Walker del Forestry Commission y al Dr. Richard Jackson de la Universidad de Surrey por todas las interesantes sugerencias realizadas a lo largo de nuestra cooperación en proyectos de investigación.

Al Dr. Robert Perrin del I.N.R.A. de Dijon por toda su ayuda, consejos y comentarios durante y después de su estancia en nuestro Departamento.

A Carlos Colinas por su apoyo y su amistad, así como por su valiosa contribución en la iniciación de la primera colección de cultivos de hongos ectomicorrícicos en España, en el marco de un proyecto de investigación dirigido por la Dra. Isabel Alvarez.

Al Sr. Emili Garolera del Consorci Forestal de Catalunya por su generosa cooperación en la realización de ensayos de campo.

Finalmente, agradezco el apoyo de toda mi familia a lo largo de mi carrera como investigador y muy especialmente de Verónica por su ayuda y apoyo incondicional. Dedico a todos ellos este trabajo y, especialmente, a la memoria de mi padre que me apoyó con ilusión hasta el último momento.

INDICE

	<u>PAG.</u>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 OBJETIVOS GENERALES E INTRODUCCION	3
1.1 SITUACION FORESTAL EN ESPAÑA	5
1.2 TECNICAS DE PRODUCCION DE PLANTA FORESTAL EN VIVERO	8
1.3 EL ABETO DE DOUGLAS. BIOLOGIA Y USO FORESTAL	10
1.3.1 Taxonomía y Distribución	10
1.3.2 Características Ecológicas y Fenología	13
1.3.3 Uso Forestal	14
1.3.4 Introducción en Europa	17
1.4 APLICACION DE LAS MICORRIZAS EN TECNOLOGIA FORESTAL	21
1.4.1 Definición y Tipos de Micorrizas	22
1.4.2 Estructura y Función de las Ectomicorrizas	24
1.4.3 Ecología de las Ectomicorrizas	28
1.4.4 Presencia de Micorrizas en Viveros	30
1.4.5 Selección de Hongos para Inoculación en Viveros	32
1.4.6 Inoculación Artificial en Viveros	33
1.4.7 Efecto de las Ectomicorrizas en Plantación	36
2 SELECCION DE HONGOS ECTOMICORRICICOS	39
2.1 HONGOS ASOCIADOS AL ABETO DE DOUGLAS	39
2.1.1 Material y Métodos	42
2.1.2 Resultados y Discusión	43
2.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HONGOS ECTOMICORRICICOS	46

2.3 SINTESIS DE ECTOMICORRIZAS EN CULTIVO PURO	52
2.3.1 Material y Métodos	56
2.3.2 Resultados	58
2.3.3 Discusión	68
3 TECNICAS DE INOCULACION DE ABETO DE DOUGLAS EN CONTENEDOR	70
3.1 PRODUCCION DE ABETO DE DOUGLAS EN CONTENEDOR	73
3.2 INOCULACIONES MONOESPECIFICAS	82
3.2.1 INOCULO MICELIAR	82
3.2.1.1 Inóculo vegetativo	83
3.2.1.1.1 Material y Métodos	85
3.2.1.1.2 Resultados	89
3.2.1.1.3 Discusión	95
3.2.1.2 Inóculo incluido en gel de alginato polimerizado	98
3.2.1.2.1 Material y Métodos	100
3.2.1.2.2 Resultados	104
3.2.1.2.3 Discusión	106
3.2.2 INOCULO EN FORMA DE ESPORAS	110
3.2.2.1 Material y Métodos	113
3.2.2.2 Resultados	116
3.2.2.3 Discusión	124
3.3 INOCULACIONES MIXTAS	128
3.3.1 INOCULACIONES DOBLES EN CULTIVO PURO	130
3.3.1.1 Material y Métodos	130
3.3.1.2 Resultados	132
3.3.1.3 Discusión	136

3.3.2 INOCULACIONES DOBLES EN CONTENEDOR	138
3.3.2.1 Material y Métodos	139
3.3.2.2 Resultados	141
3.3.2.3 Discusión	143
4 INFECTIVIDAD Y RECEPTIVIDAD DE SUELOS FORESTALES	148
4.1 Material y Métodos	150
4.2 Resultados	157
4.3 Discusión	172
5 CONCLUSIONES GENERALES	180
6 REFERENCIAS	182
ANEXO 1. Tabla de resultados globales de los ensayos de inoculaciones mono-específicas	198
ANEXO 2. Relación de las especies de hongos utilizadas	199

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo es la aplicación de técnicas de inoculación de plantas de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco) con hongos ectomicorrícicos seleccionados para las condiciones españolas, con el objetivo de mejorar la calidad de planta de reforestación. Primeramente se ha realizado un proceso de selección de hongos por hábitat, especie asociada, capacidad de crecimiento en cultivo y formación de micorrizas *in vitro*. Sobre un total de 48 cepas probadas pertenecientes a 36 especies, se han seleccionado 32 cepas en 24 especies por su capacidad micorrícica en cultivo puro. Las técnicas de inoculación de plantas producidas en contenedor han incluido inóculo vegetativo, micelio incluido en gel de alginato e inóculo de esporas aplicados a distintas dosis. El inóculo vegetativo de *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor*, *L. laccata* y *Lyophyllum decastes* ha resultado efectivo en la formación de ectomicorrizas, con dosis óptimas variables. La producción de micelio incluido en gel de alginato ha mostrado un grado variable de tolerancia de determinados hongos a las concentraciones elevadas de CaCl₂ utilizadas para polimerizar el alginato y al almacenamiento en frío. La formación de micorrizas con este tipo de inóculo se obtuvo únicamente con *L. bicolor* que resultó efectivo a bajas dosis de aplicación. El inóculo de esporas se obtuvo principalmente a partir de hongos hipogeos de fructificación regular en plantaciones adultas de abeto de Douglas. Los esporocarpos de *Rhizopogon subareolatus* y *Melanogaster ambiguus* proporcionaron un elevado número de esporas que fueron efectivas en la formación de ectomicorrizas a dosis relativamente bajas. Adicionalmente, se ha iniciado el desarrollo de técnicas de inoculaciones dobles con hongos ectomicorrícicos seleccionados. Los resultados *in vitro* han permitido determinar la capacidad colonizadora relativa y la inducción de la formación de raíces cortas de distintas especies de hongos. Los resultados obtenidos en estas condiciones indican que *L. bicolor* y *R. subareolatus* son hongos de elevada capacidad competitiva. Las inoculaciones mixtas en condiciones de contenedor han resultado en una proporción variable de plantas con dos hongos simbioses coexistiendo en el mismo sistema radicular, dependiendo de la concentración inicial de cada hongo. Finalmente, se ha iniciado el desarrollo de bioensayos con el objetivo de determinar la infectividad natural de suelos de plantación y su receptividad a las distintas especies de hongos introducidas. Los resultados se discuten en relación a su aplicabilidad en el proceso de selección de hongos adaptados a las condiciones ecológicas de las zonas a repoblar.

ABSTRACT

The main objective of this study is the application of inoculation techniques of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) seedlings with ectomycorrhizal fungi selected for Spanish conditions to improve seedling quality for reforestation purposes. A selection of fungi has been done by habitat, associated trees, capacity of growth in culture and ectomycorrhizal formation *in vitro*. A total of 32 strains in 24 species were selected from 48 strains belonging to 36 species for their ability to form mycorrhizas in pure culture. Inoculation techniques tested for container-grown seedlings included vegetative inocula, mycelia included in alginate gel, and spores inocula applied at several doses. Vegetative inocula of *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor*, *L. laccata* and *Lyophyllum decastes* were effective in ectomycorrhizal formation, with variable optimal doses. Inocula production of several fungi in alginate gel showed a variable degree of tolerance to the high concentrations of CaCl_2 used to polymerize the alginate as well as to cold storage. Mycorrhizal formation with this kind of inoculum was obtained only with *L. bicolor* which was effective at low doses. Spores were obtained mainly from sporocarps of hypogeous fungi which fruited regularly in adult Douglas-fir plantations. Sporocarps of *Rhizopogon subareolatus* and *Melanogaster ambiguus* provided a high number of spores which were effective in ectomycorrhizal formation at relatively low doses. Additionally, the development of techniques for dual inoculations with selected ectomycorrhizal fungi has been initiated. *In vitro* results allowed to assess both relative colonization ability and induction of short roots formation of several fungal species. The results obtained under such conditions indicate that *L. bicolor* and *R. subareolatus* are highly competitive fungi. Mixed inoculations in container conditions gave a variable proportion of seedlings with two fungi coexisting in the same root system, depending on the initial concentration of each fungus. Finally, the development of bioassay techniques aimed to assess the natural infectivity of plantation soils as well as their receptivity to the introduced fungi has been initiated. Results are discussed in relation to their applicability to the selection process of fungi adapted to the conditions of the reforestation sites.

1. OBJETIVOS GENERALES E INTRODUCCION

El objetivo general de este trabajo es la puesta a punto y aplicación de técnicas de inoculación de plantas de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco) producidas en contenedor con hongos ectomicorrícicos seleccionados para las condiciones españolas. La presencia de micorrizas en el sistema radicular de la planta es vital para su desarrollo en campo, por lo que es necesario considerar este parámetro en la evaluación de la calidad de planta producida en vivero para su uso en reforestación. La aplicación de técnicas de inoculación con hongos ectomicorrícicos en el manejo de viveros puede permitir la mejora fisiológica del sistema radicular y proporcionar a la planta mayores posibilidades de supervivencia y crecimiento después del trasplante a campo.

El desarrollo de un plan de inoculación controlada debe seguir un orden lógico de investigación con objetivos concretos. Estos puntos constituyen la diferenciación en capítulos de esta memoria:

1. Definición de la situación forestal particular (Introducción). Antes de establecer un plan de inoculación controlada, es importante encuadrar la zona de aplicación de la inoculación y sus condiciones particulares (clima, tipo de suelo o sustrato, especie, sistema de producción, técnicas de plantación, etc.). La situación forestal española se caracteriza por el déficit creciente de madera y sus subproductos, el descenso progresivo de la superficie anual repoblada y el aumento de la destrucción de la superficie arbolada por incendios. Adicionalmente, la adhesión de España a la C.E.E. conlleva la necesidad de la reconversión de zonas agrícolas marginales a uso forestal. La utilización del abeto de Douglas en este trabajo responde al potencial de utilización de esta especie para la producción de madera en nuestro país y al interés de la C.E.E. en su estudio. La producción de esta especie en

contenedor centra los ensayos de este trabajo por su futuro como planta productora de madera de calidad, su menor tiempo de producción en vivero y la facilidad de su manejo. En la segunda parte de la introducción se realiza una revisión bibliográfica sobre la estructura y función de las micorrizas y su aplicación en reforestación.

2. Aislamiento y selección de hongos en el laboratorio. Dentro de este punto se incluye como objetivo el seguimiento de los hongos que fructifican de forma natural en las zonas de reforestación para elegir las especies fúngicas potencialmente aplicables. La introducción de una especie arbórea exótica requiere conocer si en la zona de trasplante se encuentran hongos ectomicorrícicos compatibles. Los criterios de selección posteriores se basan en la facilidad de crecimiento del hongo en cultivo puro, la resistencia a la manipulación y la capacidad de formación de ectomicorrizas.

3. Técnicas de inoculación en vivero. La obtención de aislamientos formadores de ectomicorrizas en cultivo puro forma parte de la primera fase de la selección, que debe completarse en condiciones reales de vivero. Los objetivos de este punto son: la puesta a punto de distintas técnicas de inoculación de abeto de Douglas producido en contenedor con hongos ectomicorrícicos seleccionados, la evaluación de sus tasas de infectividad y las dosis óptimas de aplicación.

4. Receptividad del suelo de trasplante. La respuesta en campo de la planta inoculada es el test último y decisivo para determinar el efecto de la inoculación en vivero. La permanencia del hongo en campo tras la inoculación en vivero depende principalmente de parámetros físico-químicos del suelo y de su flora microbiana incluyendo los hongos micorrícicos nativos. Este tipo de investigación requiere el seguimiento de la planta en campo durante un largo período de tiempo. El objetivo de este punto es el desarrollo de técnicas

rápidas de evaluación de la persistencia del hongo inoculado en diferentes suelos de plantación mediante bioensayos. De este modo se pretende obtener información previa de gran importancia en la elección del hongo a introducir en la zona de trasplante.

1.1 SITUACION FORESTAL EN ESPAÑA

En España existen actualmente unos 12.5 millones de Ha de superficie arbolada y 14 millones de Ha de montes desarbolados (C.E.E. 1984). De los montes desarbolados, unos 2.5 millones de Ha corresponden a montes de la vertiente atlántica con alturas entre 0 y 800 m. susceptibles de ser repoblados con especies de crecimiento rápido (con producción superior a los 10 m³/Ha/año).

Según estos datos, España es el segundo país de la C.E.E. en superficie arbolada tras Francia (14.8 millones Ha). La composición de especies se reparte entre un 48 % de coníferas y un 52 % de frondosas. Un 6 % de los bosques son de dominio público, un 65 % privados y un 4 % pertenece a otras colectividades de Derecho público (fuente: EUROSTAT, 1976-1986).

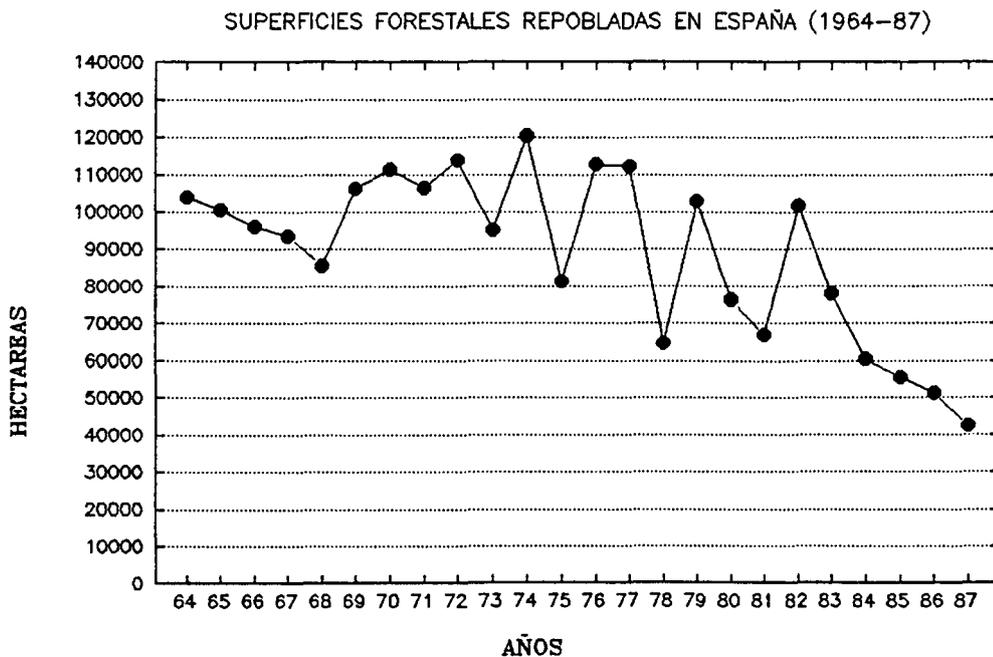
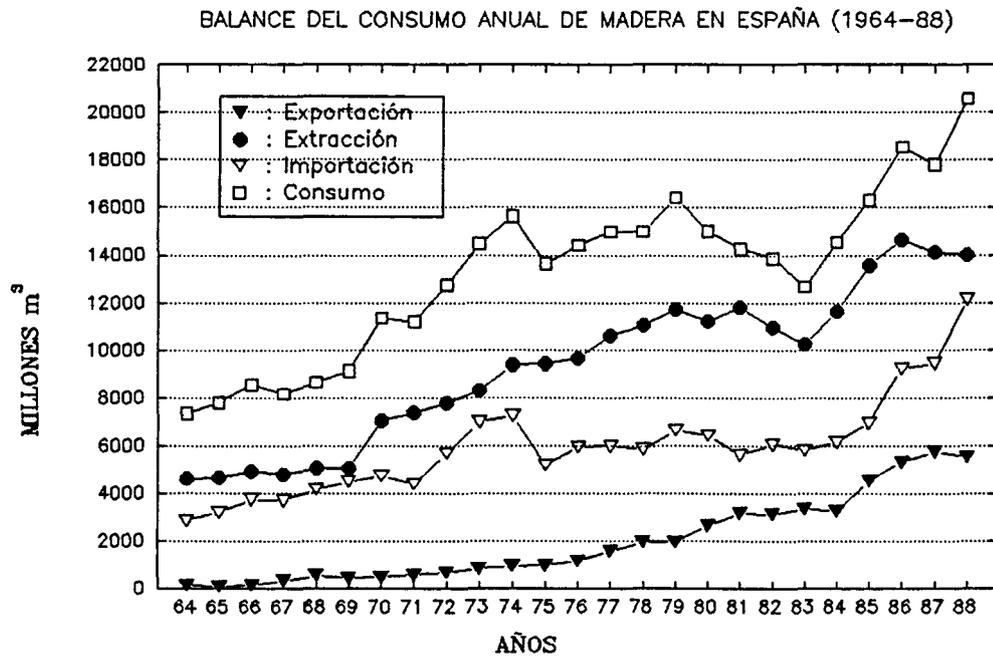
El consumo de madera a lo largo de los últimos años, con datos disponibles en el Anuario de Estadística Agraria publicado por el MAPA (1988), se representa en la Figura 1.1.(a). En el gráfico se observa un mantenimiento del déficit con un máximo en 1974 (6.3 millones de m³) y mínimos en los años 1981 y 1983 con 2.5 millones de m³. Hasta 1974 se observa un incremento creciente del consumo, bajando en años posteriores como consecuencia de la crisis económica internacional. A partir de 1983 se vuelve a producir una tendencia creciente al consumo y al aumento del déficit.

Las extracciones están influidas por el consumo a través de los precios, lo cual puede provocar un adelanto de la fecha de corta en función de los precios de la madera. Las extracciones totales realizadas entre 1960

FIGURA 1.1.(a)

Balance del consumo nacional de madera en el período 1964-88, y superficies forestales repobladas en España en el período 1964-87 por la Administración y por iniciativa privada.

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. MAPA 1988.



y 1987, que ascienden a unos 10 millones de m³, se deben en sus 3/4 partes a montes privados. El índice de autoabastecimiento durante los últimos 25 años ha mejorado muy ligeramente (Almansa 1990). El consumo ha mostrado un notable incremento y se estima que continúe aumentando en los próximos años, provocando un desequilibrio en el comercio exterior de madera y derivados. Los costes netos de la balanza de comercio exterior de madera y derivados durante los años 1987, 88 y 89 ha sido de 54, 69 y 85.000 millones de pesetas respectivamente (Almansa 1990).

Actualmente se detecta una clara tendencia a la participación creciente de los montes privados en la producción de madera y al incremento de las producciones de especies de turno corto. La propiedad forestal en la zona productiva del norte de España se encuentra muy dividida y la legislación actual tiende a la parcelación de los montes vecinales. El incremento de la producción implicaría la concentración de propiedades para realizar en común trabajos de repoblación y manejo forestal con incentivos técnicos, fiscales y financieros.

Las superficies repobladas han decrecido drásticamente desde 1982 y no muestran un incremento acorde con la demanda creciente de madera (Fig. 1.1.(a)). El incremento de repoblaciones forestales con el objetivo de incrementar la producción de madera, debería considerar aquellas especies arbóreas productivas y resistentes (generalmente originarias del continente americano) que permitan paliar la pérdida de información genética y la escasez de especies arbóreas nativas en Europa (Hermann 1987).

Igualmente, la incorporación de las tierras marginales (aquellas con cultivos excedentarios o no rentables) al sector forestal puede ser una alternativa que genere recursos forestales, actualmente deficitarios en toda la C.E.E. Este tipo de tierras ocupan en España alrededor de 2 millones de hectáreas (Abreu 1990).

1.2 TECNICAS DE PRODUCCION DE PLANTA FORESTAL EN VIVERO

La producción de plantas en viveros forestales puede realizarse a raíz desnuda y en contenedor. Ambos tipos presentan ventajas e inconvenientes (Tinus y McDonald 1979).

En los viveros a raíz desnuda, las plantas crecen en almácigas expuestas bajo determinadas condiciones culturales, son extraídas del suelo, seleccionadas y embaladas para su envío a la zona de plantación.

Las principales características de los viveros a raíz desnuda son:

- Los árboles crecen en el suelo. Como consecuencia, se requiere un suelo adecuado para el crecimiento.
- Se requieren grandes cantidades de agua para irrigación.
- Las plantas están expuestas al tiempo adverso.
- Se requiere una superficie considerable de terreno de buena calidad, maquinaria especial, edificios de soporte y sistemas de irrigación.
- La optimización de costos requiere trabajar al límite de la capacidad del vivero.
- Los períodos de crecimiento están controlados por el clima.
- Se requiere poca energía en comparación con los invernaderos.
- Las plantas pueden ser empaquetadas en poco volumen aunque requieren humedad y bajas temperaturas para su mantenimiento.
- La capacidad amortiguadora de las condiciones ambientales permite minimizar los errores culturales.

La producción de plantas en contenedor se refiere a viveros en los que las plantas crecen en un substrato dentro de un contenedor especialmente diseñado. Los contenedores pueden mantenerse al aire libre en climas templados, aunque en climas más rigurosos se sitúan en un invernadero o umbráculo donde se puede controlar el ambiente. Las principales

características de este tipo de producción son:

- Puede establecerse en tierras con poco valor agrícola.
- No se requiere una gran cantidad de agua.
- Las plantas no están expuestas a situaciones climáticas extremas, por lo que la producción es más segura.
- La producción puede ajustarse a la demanda con más facilidad que en la producción a raíz desnuda, ya que cada unidad de producción funciona de manera independiente con sus propios costos.
- Se utiliza una gran cantidad de energía que se consume para incrementar la velocidad y seguridad en la producción.
- Los contenedores son voluminosos para embalar y enviar. Sin embargo, el mantenimiento de las plantas en buen estado es más fácil que en las plantas producidas a raíz desnuda.
- El ambiente controlado del invernadero dificulta la aparición de enfermedades y plagas, aunque su diseminación e incidencia suele ser mayor que en viveros a raíz desnuda.
- La producción de plantas en contenedor es más rápida que a raíz desnuda.

El interés por la producción de planta en contenedor se extendió desde principios de la década de los 50 para acortar el período de producción y hacer más eficiente el uso de semilla mejorada genéticamente (Tinus y Owston 1984). Desde entonces, se han realizado múltiples mejoras técnicas que han incrementado la producción y mejorado la respuesta en campo de las plantas. Entre los primeros contenedores utilizados se encuentran las bolsas perforadas de polietileno que han tenido buena aceptación por su bajo precio. Sin embargo, este tipo de contenedores provoca el crecimiento circular de las raíces que hacen problemático el sostenimiento de la planta, provocando pérdidas importantes en la plantación (Ben Salem 1971; Tinus 1978).

La mayoría de los contenedores actuales tienen una capacidad entre 65 y 165 c.c. y se mantienen a densidades de 6 - 11 unidades / dm². La forma del contenedor es importante para el correcto crecimiento de la raíz de la planta. Los contenedores más adecuados tienen nervios longitudinales a lo largo de la parte interna del contenedor y un agujero en la base, lo que permite a la raíz crecer correctamente y autopodarse al llegar al final del contenedor, con lo que se previene la espiralización radicular (Hiatt y Tinus 1974).

Las enfermedades y plagas en viveros en contenedor, así como los factores abióticos de estrés (temperatura, luz, deficiencias de nutrientes, pH, irrigación, estrés salino, polución, viento, etc.) son una de las principales preocupaciones de los viveristas (Landis et al. 1989). Los efectos en contenedor suelen ser catastróficos por las condiciones de crecimiento que favorecen a las enfermedades y la susceptibilidad de las plantas en crecimiento activo a los factores abióticos.

El manejo de plagas se realiza mediante medidas culturales y químicas. Esta última medida debe considerarse como una opción dentro de un programa de manejo que debe incluir medidas de prevención, protección, erradicación y resistencia (Smith 1970; Bohmont 1983). Los substratos artificiales de los viveros de contenedor están inicialmente libres de patógenos y plagas, por lo que el principal esfuerzo debe orientarse hacia la prevención contra la entrada de patógenos en el vivero y el control de las prácticas culturales para minimizar la presencia de factores de estrés abiótico.

1.3 EL ABETO DE DOUGLAS. BIOLOGIA Y USO FORESTAL.

1.3.1 Taxonomía y Distribución.

El abeto de Douglas o pino de Oregon (*Pseudotsuga menziesii*)

(Mirb.) Franco 1950 *sin.* *P. taxifolia* (Lamb.) Britt. 1889, *P. douglasii* (Loud.) Carr 1867) es una conífera originaria de América del Norte perteneciente a la familia Pinaceae, la más numerosa entre las coníferas. El número de especies de *Pseudotsuga* es considerado actualmente como de seis (Orr-Ewing 1966; Thomas y Ching 1968). Estas especies son nativas de China, Formosa, Japón y Norteamérica. *P. menziesii* (Mirb.) Franco es la especie más importante desde el punto de vista económico y de distribución, extendiéndose desde la costa del Pacífico hasta la vertiente este de las Montañas Rocosas. *P. macrocarpa* Mayr. se encuentra en el sur de California y en el norte de Baja California. Las especies asiáticas son *P. forrestii* Craib., *P. japonica* Beissner, *P. sinensis* Dode y *P. wilsoniana* Hayata.

P. menziesii constituye la formación forestal más productiva de Norteamérica. Las variaciones morfológicas dentro de la especie justifican la distinción de dos subespecies:

- *P. menziesii* subsp. *menziesii* (Mirb.) Franco (Douglas costero o verde).
- *P. menziesii* subsp. *glauca* Mayr. (Douglas de interior o azul).

En las zonas donde ámbas subespecies coinciden de forma natural, en la Columbia Británica, el tipo intermedio es, en ocasiones, denominado *P. caesia* Flous (Douglas gris).

A nivel infraespecífico, la especie presenta una importante variabilidad como consecuencia de su repartición geográfica. El abeto de Douglas es la conífera americana de distribución más amplia en latitud (de 19°N en México a 55°N en la Columbia Británica (Canadá) (Figura 1.3.(a)). La distribución natural se extiende a lo largo de la vertiente oeste de las Cascades a continuación de la isla de Vancouver, hasta California con presencia a altitudes que van desde 0 a 1700 m. En esta zona, la altura total de los árboles

sobrepasa a menudo los 60 m. En la zona este de las Cascades, en Sierra Nevada y en las Montañas Rocosas, los individuos raramente sobrepasan los 30 m. de altura total y pueden encontrarse a altitudes de hasta 3300 m.

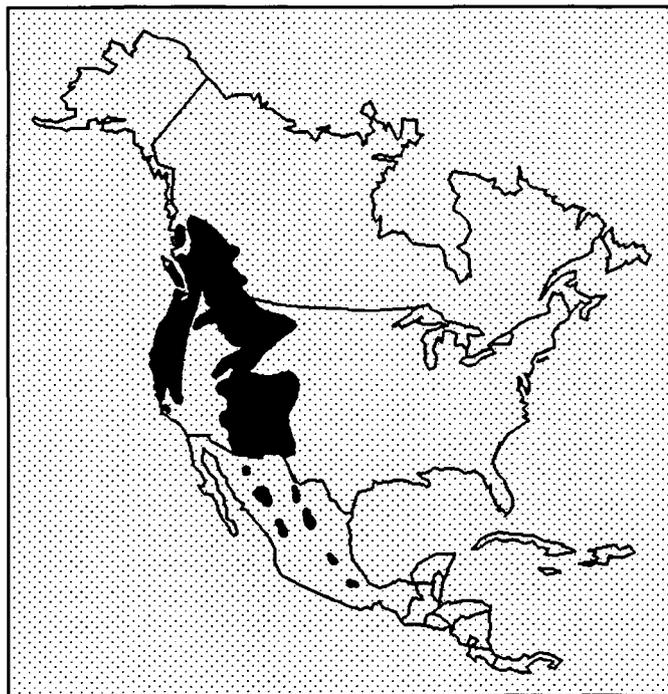
En la parte sur de su área de distribución, la especie únicamente ocupa la vertiente norte, mientras que a latitud o altitud elevada, se encuentra en la vertiente sur.

Hacia el este, se extiende por Alberta, Montana, Wyoming, Colorado y Nuevo México. También se encuentra ocasionalmente a gran altitud en México.

Las condiciones climáticas de su área de distribución son también muy variables, con temperaturas medias anuales desde 7 a 13°C y precipitaciones desde 400 a 2000 mm / año.

FIGURA 1.3.(a)

Area de distribución natural del abeto de Douglas en Norteamérica.



1.3.2 Características Ecológicas y Fenología

El abeto de Douglas es una especie plástica, aunque las condiciones ecológicas más favorables a su desarrollo son las siguientes (Arbez 1987):

- Temperatura media anual de 9 a 10°C.
- Pluviosidad de 800 a 1200 mm anuales.
- Suelo profundo y permeable con pH de 4.5 a 6.

La especie presenta una relativa resistencia al frío invernal y a la sequía estival, aunque el viento constituye un elemento desfavorable. La tasa de crecimiento y la resistencia al frío, insectos y enfermedades varían en todo su rango de distribución.

En su medio natural son relativamente frecuentes los incendios catastróficos, resultando menos dañado por el fuego que otras especies, debido a su corteza espesa y acolchada. Este factor, unido a la larga longevidad de la especie, ha motivado la constitución de grandes masas puras e iguales en su área de distribución.

El crecimiento estacional comienza cuando las yemas vegetativas se rompen en primavera. Sin embargo, existe un considerable crecimiento dentro de las escamas de la yema previo a la rotura y responsable de ésta. Las yemas se forman completamente en octubre-noviembre y entran en dormición a principios de diciembre. En este período hay una reducción de la actividad fisiológica. La aparición de formación de yemas a finales del verano no implica la reducción de la actividad fisiológica ya que, aunque no se detecten cambios externos, continúa la división celular y el crecimiento hasta finales de otoño.

El abeto de Douglas es una especie monoica, con un número de cromosomas haploide de 13 en lugar de los 12 básicos de las Pinaceae. Los estróbilos masculinos y femeninos rompen la yema desde finales de invierno

a primavera, alrededor de un año después de su formación como primordios de yemas axilares. La polinización ocurre durante un período de unas 2 - 3 semanas. La fertilización de los estróbilos femeninos ocurre unas 10 semanas tras la polinización. Las semillas se desarrollan a lo largo del final de la primavera y el verano, alcanzando la madurez entre agosto y septiembre. Las piñas generalmente empiezan a secarse y cambiar su color a marrón en agosto o septiembre, siendo liberadas la mayoría de las semillas en septiembre y octubre. La fenología varía según la altitud y la latitud, entre árboles individuales en una determinada localidad, y según la posición dentro de cada árbol. También las condiciones climatológicas de cada año pueden hacer variar las épocas en las que tienen lugar los procesos reproductores.

Las piñas maduras del abeto de Douglas se identifican fácilmente por las brácteas trilobuladas que sobresalen de las escamas. Bajo cada escama, se forman dos semillas con alas relativamente grandes. El número de semillas por piña varía entre 20 y 30 en *P. menziesii* subsp. *glauca* y entre 26 y 50 en *P. menziesii* subsp. *menziesii* dependiendo del tamaño de la piña. Las semillas se diseminan por gravedad y por efecto del viento (Owston y Stein 1974).

1.3.3 Uso Forestal

La madera del abeto de Douglas tiene gran resistencia y es frecuentemente utilizada como elemento estructural. Otros usos incluyen tablones para construcción, madera laminada en tres capas (plywood), postes y pulpa. Esta especie puede producir, en turnos de unos 60 años, hasta 20 m³/Ha/año, con lo que se encuadra dentro de las especies de crecimiento rápido con una elevada calidad de madera.

La corteza, que constituye alrededor del 12-15 % del volumen del tronco en los árboles adultos y un 8 % en el árbol joven, es frecuentemente utilizada en Estados Unidos como substrato para usos agrícolas (Bollen

1969). En muchas partes del mundo, el abeto de Douglas se utiliza para la producción de madera ornamental y como árbol de Navidad.

La producción de abeto de Douglas en vivero a partir de semilla, puede realizarse a raíz desnuda y en contenedor. La producción en pequeños contenedores es muy adecuada para el abeto de Douglas, ya que el crecimiento circular de las raíces es mucho menor que en otras especies de coníferas y la producción de plantas adecuadas para trasplante es posible en un año. En la Tabla 1.3.(a) se detallan los requerimientos de crecimiento de abeto de Douglas producido en contenedor a lo largo de una estación vegetativa.

La propagación vegetativa puede realizarse por estaquillado, injerto o propagación *in vitro*.

El potencial de enraizamiento de las estaquillas es alto para material procedente de árboles de 9 a 12 años, pero baja rápidamente con la edad. El rejuvenecimiento de árboles maduros por manipulación en el monte (poda) o tras el injerto en el banco de clones ha sido estudiado por Franclet (1980). El plagiotropismo es frecuente durante 3-8 años tras la plantación.

La incompatibilidad del injerto puede alcanzar el 40-50 % y prolongar su aparición hasta 15-20 años. El descubrimiento del tipo de control genético de la compatibilidad ha permitido establecer cruzamientos controlados ampliamente compatibles (Copes 1973, 1974).

La micropropagación del abeto de Douglas ha sido objeto de varios estudios (Cheng 1975; Cheng y Voqui 1977; Cheng 1978; Boulay 1979). Uno de los obstáculos del éxito de la micropropagación es la dificultad e inconsistencia del enraizamiento. El porcentaje de enraizamiento y el número de raíces producidas está influido por el substrato de enraizamiento, la concentración de sucrosa y boro en el medio y la altura y generación de los tallos (Mohammed et al. 1989).

TABLA 1.3.(a)

Requerimientos de crecimiento a lo largo de una estación para plantas de abeto de Douglas producidas en contenedor (Tinus y McDonald 1979).

ESTACION	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB
ESTADO CRECIMIENTO	siembra	germinación	crecimiento	crecimiento			Endurecimiento	Endurecimiento	Endurecimiento	Endurecimiento		Dormición
TEMP. DIA (°C)							Form. yemas					
OPTIMA		23-30	23-30	21-27			24-27	7-13	2-5			2-5
PERMITIDA		21-30	21-32	13-32			10-30	5-21	-1-5			-4-10
TEMP. NOCHE (°C)												
OPTIMA		13-21	13-16	13-16			13-16	5-10	0-3			0-3
PERMITIDA		16-27	10-18	10-18			8-18	2-16	-4-8			-4-5
HUMEDAD REL. (%)												
OPTIMA		65-80	50-70	50-70				Idem				
PERMITIDA		55-90	40-80	40-80				"				
% LUZ SOLAR		50-75	65-80			100		50-100				
FERTILIZACION		No	Completa. Alta en N pH 5-5.5				Completa. Baja en N. Alta en PK.					

1.3.4 Introducción en Europa

El abeto de Douglas fue introducido por primera vez en Inglaterra en 1827 por David Douglas y se empezó a plantar extensivamente en Europa tras la Primera Guerra Mundial y, sobre todo, tras la Segunda Guerra Mundial. Actualmente es la especie arbórea norteamericana más extendida en Europa, la primera especie utilizada para reforestación en Francia y la primera especie exótica plantada en Alemania. Es también una especie importante en numerosos países europeos: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, Gran Bretaña, Holanda, Italia, Portugal, Rumanía, etc. En el hemisferio sur ha sido introducida en Australia, Chile y Nueva Zelanda. El éxito de su introducción se debe, probablemente, a una combinación entre condiciones favorables y procedencias adecuadas en las primeras plantaciones en Alemania, Dinamarca e Islas Británicas (Matthews 1983).

La introducción en Francia data de mitad del siglo XIX. Las plantaciones comenzaron a extenderse tras la creación del Fondo Forestal Nacional en 1947. Las zonas de plantación más destacadas son: Beaujolais, Limousin, Morvan y Normandie, utilizando la subespecie *P. menziesii menziesii* esencialmente. La producción anual de plantas es de unos 25 millones en viveros franceses. Las necesidades anuales de semillas oscilan entre 1 y 2.5 toneladas. Actualmente existen entre 220.000 y 250.000 Ha plantadas con abeto de Douglas en Francia, constituyendo probablemente la mayor extensión de la especie fuera de su área natural. La edad de explotación se sitúa en torno a los 50-60 años. Al ritmo actual de reforestación (10.000-13.000 Ha / año que constituye del 25 al 30 % de la superficie total reforestada), se estima que el abeto de Douglas cubrirá alrededor de 500.000 Ha hacia el año 2010. La producción en esta fecha se situará entre los 12 y los 25 m³/Ha/año.

La producción francesa de abeto de Douglas se realiza casi exclusivamente a raíz desnuda. La disponibilidad de terrenos adecuados y la

concentración de viveros en distintas áreas ecológicas han hecho adecuado este tipo de producción.

Los mayores vigores registrados en Francia provienen de abeto de Douglas costeros originarios de Washington (zona oeste de las Cascades a una altitud inferior a los 500 m., sur de la Península de Olympia y sur del Estado) y Oregon (cordillera costera). Estas procedencias combinan características de vigor y de rotura de yemas tardía, siendo este último un factor favorable de resistencia a las heladas tardías.

El Ministerio de Agricultura francés, bajo propuesta del CEMAGREF, ha establecido 7 regiones de procedencia en Francia con poblaciones productoras de semillas. Las zonas de utilización de abeto de Douglas en Francia tienen definidas las regiones de procedencia recomendadas.

El abeto de Douglas muestra una excelente resistencia a los ataques de enfermedades e insectos. Los principales agentes bióticos a los que la especie muestra sensibilidad en Europa se representan en la Tabla 1.3.(b).

Las primeras experiencias para seleccionar procedencias adecuadas para la utilización de la especie en España fueron llevadas a cabo en 1963 por F. Molina en el Centro Forestal de Lourizán (Pontevedra) a partir de procedencias comerciales de Estados Unidos. Inicialmente, se instalaron parcelas con 14 procedencias en las provincias de Lugo y León. Más tarde, los ensayos continuaron con 87 procedencias de la colección IUFRO de semillas recolectadas en 1966 y años sucesivos. En el mismo Centro Forestal de Lourizán, G. Toval y equipo iniciaron en 1978 un proyecto de introducción de especies forestales. Las primeras parcelas de ensayo con *P. menziesii* se instalaron a partir de procedencias de la colección IUFRO. En 1985 se instalaron parcelas con 33 procedencias regionales de Oregon (Siskiyou N.F., Umpqua N.F. y Roque River N.F.) y 20 de California (Siuslaw N.F.) (Toval et al. 1982).

Los primeros resultados, tras 10 años de ensayo, de las procedencias IUFRO de abeto de Douglas han permitido centrar las posibles áreas óptimas

de recogida de semillas para el norte de España. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 1.3.(c). El mejor crecimiento en altura corresponde, tanto en vivero como en campo, a procedencias de la vertiente oeste de las Cascadas, en latitudes comprendidas entre 42° y 47°N. La vertiente oriental de la misma cordillera proporcionó peores procedencias.

TABLA 1.3.(b)

Principales enfermedades y plagas que afectan al abeto de Douglas en Europa (Arbez 1987).

AGENTE	CAUSAL	SINTOMATOLOGIA
ENFERMEDADES (HONGOS)	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium</i> sp. <i>Phytophthora cinnamomi</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Podredumbre del cuello radicular (damping off). Elevada mortalidad de plántulas en vivero.
	<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i>	Amarilleo de acículas y caída en dos o tres años.
	<i>Armillariella mellea</i>	Podredumbre de raíces y desecación del árbol que comienza por la parte superior.
	<i>Rhabdocline pseudotsugae</i>	Aparición de manchas amarillas en acículas y caída parcial de éstas.
PLAGAS (INSECTOS)	<i>Hylobius abietis</i>	Descortezamiento de plantas jóvenes y destrucción total.
	<i>Gilletteella cooleyi</i>	Manchas blancas céreas en la parte inferior de las acículas. También manchas amarillas y deformaciones en hojas.

El clima del norte de España es muy apropiado para el desarrollo del abeto de Douglas ya que esta especie puede soportar una ligera sequía. La producción, en turnos de 60 años, se sitúa alrededor de los 20 m³/Ha/año.

Basándose en las superficies disponibles para reforestar en el norte de España y el amplio rango de altitudes que se pueden plantar con *P. menziesii*, se estima que la superficie total susceptible de ser plantada con esta especie supera las 500.000 Ha. La superficie total plantada con esta especie actualmente se desconoce a nivel de inventario aunque puede estimarse a partir de los datos proporcionados por las diferentes Comunidades Autónomas. De este modo, el número total de Ha se sitúa en torno a las 4500-5000, repartidas por Comunidades de la siguiente manera: Cataluña 1000 Ha, Galicia 300 Ha, La Rioja 500 Ha, Navarra 300 Ha, País Vasco 1720 Ha, con producción anual de planta de 930.000 unidades (Gobierno Vasco 1988), y el resto en plantaciones muy repartidas.

TABLA 1.3.(c)

Orígenes de semilla procedentes de los Estados de Washington y Oregon probados para el norte de España y estimación de resultados. (Fuente: Ensayos de Procedencias del Centro Forestal de Lourizán (Pontevedra).

Mejores	Buenos	Indiferentes	Desaconsejables
403	202	221	402
411	430	231	001
412	041	012	622
232	042	653	631
030	440	252	641
261	052	482	662
262	251	491	511
053	452	270	
061		072	

Actualmente, la utilización de la especie en nuestro país tiende a aumentar gracias a las subvenciones proporcionadas por la C.E.E. para la investigación de su establecimiento como especie de interés forestal en Europa. En estos momentos, la superficie forestal ocupada por esta especie es muy inferior a la de otros países como Francia, que posee una superficie potencial de plantación muy similar.

1.4 APLICACION DE LAS ECTOMICORRIZAS EN TECNOLOGIA FORESTAL

La mayoría de los criterios de calidad de planta para reforestación en España se limitan a la condición y tamaño de la parte aérea, prestando menor atención a la calidad de las raíces en las plantas de vivero. La función del sistema radicular es la de proveer un soporte estructural y la captación de nutrientes y agua, por lo que resulta de vital importancia para determinar el estado fisiológico de la planta. La mejora de la calidad del sistema radicular incrementa la supervivencia y el crecimiento de las plantas posteriormente al trasplante en campo (Van Eerden y Kinghorn 1978; Sutton 1979, 1983; Gadgil y Harris 1980; Ritchie y Dunlop 1980; Marx y Hatchell 1986). La calidad del sistema radicular depende de la ramificación y la abundancia de raíces cortas fisiológicamente capaces de establecer un contacto rápido con el suelo de plantación.

Tras la plantación, las raíces deben funcionar bajo condiciones ambientales y bióticas drásticamente distintas a las del vivero (elevada humedad y fertilización). En suelos naturales, todos los árboles forestales forman simbiosis mutualísticas entre las raíces y hongos del suelo especializados. El órgano mixto hongo-raíz resultante se denomina *micorriza*. Las micorrizas proporcionan beneficios a la planta joven y adulta, especialmente incrementando la superficie de absorción de agua y nutrientes en el sistema radicular de la planta (Harley 1969; Bowen 1973). Igualmente,

los hongos micorrícicos requieren este tipo de simbiosis para completar su ciclo biológico (Hacskeylo 1971).

La dependencia de las plantas de sus micorrizas ha sido demostrada con los fracasos obtenidos en la reforestación de zonas carentes de inóculo natural con plantas no micorrizadas (Trappe 1977; Marx 1980). La presencia y abundancia de micorrizas debe ser un factor de consideración para evaluar la calidad del sistema radicular de planta de reforestación y para predecir el éxito del trasplante (Landis et al. 1989).

1.4.1 Definición y Tipos de Micorrizas

Las micorrizas son órganos complejos resultantes de la simbiosis mutualística entre raíces de plantas vasculares y hongos. Esta asociación juega un papel de gran importancia en ecosistemas naturales y en los sistemas biológicos creados por el hombre (Harley y Smith 1983). Se estima que alrededor de un 95 por ciento de las especies de plantas vasculares actuales pertenecen a familias que forman micorrizas (Trappe 1977, 1987).

En este tipo de simbiosis, dos o más organismos fisiológicamente distintos actúan como componentes de un solo organismo, en el cual el conjunto y cada componente por separado están sujetos a variación, selección y evolución. Ambos componentes tienen un proceso reproductivo distinto y, generalmente, un potencial de vida libre.

Las micorrizas pueden tomar variadas formas dependiendo de la naturaleza de la planta y del hongo. La primera descripción de las micorrizas con estructura reconocible fue realizada por Frank en 1885. En esta descripción inicial se reconocieron micorrizas en las cuales el hongo no penetra en las células del huésped y forma un manto externo de tejido fúngico que envuelve la raíz (micorrizas ectotróficas) y otro tipo de asociación en la que el hongo no forma manto y se extiende intra e intercelularmente en el tejido del huésped, formando órganos o estructuras fúngicas en el interior de

las células (micorrizas endotróficas).

Posteriores revisiones de la terminología sustituyeron los términos descritos por Frank por los de ectomicorriza, endomicorriza y ectendomicorriza según la zona de desarrollo del hongo (Peyronel et al., 1969). En las ectomicorrizas, el hongo se desarrolla alrededor de las células corticales de la raíz, formando una estructura denominada red de Hartig, y no existe penetración en el interior de las células. En las endomicorrizas existe penetración en el interior de las células radiculares y no se forma red de Hartig. En las ectendomicorrizas se genera red de Hartig y existe penetración celular.

Desde un punto de vista morfológico y en base a los taxones de los simbiontes, se distinguieron posteriormente siete tipos de micorrizas: ectomicorrizas, vesículo-arbusculares, ectendomicorrizas, arbutoides, ericoides, monotropoides y orquidáceas (Harley y Smith 1983).

Una caracterización amplia de las ectomicorrizas permite englobar a las ectomicorrizas *sensu stricto* con las ectendomicorrizas y las micorrizas arbutoides. La diferencia morfológica entre ellas radica en la ausencia de penetración intracelular del hongo en las ectomicorrizas, mientras que en las ectendomicorrizas y micorrizas arbutoides, el hongo penetra las células corticales de la raíz.

Las ectomicorrizas son formadas por casi todos los grupos de Basidiomycetes, muchos Ascomycetes hipogeos y algunos epigeos, y por hongos del género *Endogone* (aseptados). Este tipo de micorrizas se caracteriza por la formación de una estructura denominada manto, compuesta de hifas del hongo densamente agrupadas que envuelve las raíces finas del huésped. El manto puede ser muy delgado en las ectomicorrizas formadas por *Endogone*. A partir de esta estructura, pueden irradiar hifas o cordones miceliares hacia el sustrato. También las hifas penetran hacia el interior del tejido del huésped formando un complejo intercelular denominado red de Hartig. No existe penetración intracelular. Las plantas que forman

ectomicorrizas son árboles o arbustos pertenecientes a las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae y Tiliaceae, así como muchos miembros de las Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Juglandaceae, Mirtaceae y otras (Meyer 1973; Harley y Smith 1983). En este grupo se incluyen la mayoría de las especies arbóreas de interés forestal en climas templados.

Las ectendomycorrizas se caracterizan por un manto muy reducido o ausente, red de Hartig bien desarrollada y penetración de las hifas en las células del huésped. Se encuentran asociadas con coníferas, y se encuentran en plantas de vivero (Laiho 1965; Mikola 1965; Wilcox y Ganmore-Neumann 1974). La identidad de los hongos simbioses fue desconocida durante muchos años, nombrándolos genéricamente como "E-strains" (Laiho 1965; Mikola 1965; Wilcox et al. 1974). Posteriormente se han identificado algunos hongos como miembros de los Discomycetos (Yang y Korf 1985a, 1985b; Piche et al. 1986) o pertenecientes a algunos géneros de Hongos Imperfectos (Wilcox et al. 1974; Wilcox y Wang 1987).

Las micorrizas arbutoides están provistas de manto, hifas de proyección externa y, normalmente, red de Hartig bien desarrollada con penetración intracelular. Las plantas hospedadoras pertenecen a los géneros *Arbutus* y *Arctostaphylos* (Molina y Trappe 1982b; Harley y Smith 1983). Al ser estos géneros componentes del sotobosque en ecosistemas ectomicorrícicos, en los que los mismos hongos forman micorrizas arbutoides con unas plantas hospedadoras y ectomicorrizas con otras, se ha considerado que las micorrizas arbutoides están mejor clasificadas como un tipo especial de ectomicorrizas (Molina y Trappe 1982b).

1.4.2 Estructura y Función de las Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas son órganos dinámicos que cambian desde un estado juvenil a la madurez y senescencia (Harley y Smith 1983). Las micorrizas pueden desaparecer tras un periodo de actividad, o adaptarse a

ciclos de crecimiento (rasgo común en los sistemas radiculares perennes de los árboles). Los cambios estructurales durante el desarrollo se corresponden con diferentes situaciones fisiológicas.

En estadios iniciales de la infección, las hifas se desarrollan alrededor de células corticales diferenciadas y metabólicamente activas formando la red de Hartig. En estadios de madurez, las células corticales de la raíz activas metabólicamente se hallan rodeadas de un sistema de hifas en su práctica totalidad. El estadio de dormición se caracteriza por la formación del metacutis, consistente en una capa protectora constituida por suberificación de las paredes celulares y acumulación de polifenoles en las células del ápice radicular. De este modo, el meristemo radicular queda protegido y separado del hongo (Kottke y Oberwinkler 1986).

La zona distal de los sistemas de hifas que constituyen la red de Hartig contiene un citoplasma denso rico en ribosomas, retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias, que frecuentemente recubren las paredes de las hifas. En la zona proximal se sitúan grandes vacuolas. Esta estructura indica la localización de un transporte de nutrientes metabólico y bidireccional (Kottke y Oberwinkler 1986).

El manto fúngico está formado por un plecténquima de hifas. Este plecténquima puede estar tan densamente entrelazado que no se aprecie la naturaleza filamentosa de las hifas, recibiendo entonces el nombre de pseudoparenquima o sinénquima. Las estructuras pseudoparenquimáticas pueden tener células aproximadamente isodiamétricas con paredes rectas o en forma de puzzle con paredes onduladas. Los espacios entre hifas pueden ser grandes o cementados con una matriz formada por las paredes de las hifas. Si las hifas son reconocibles, la estructura se denomina plecténquima o prosénquima (Chilvers 1968; Dominik 1969; Godbout y Fortin 1985).

En muchas ectomicorrizas se encuentran cordones miceliares y rizomorfas, con estructura dependiente de la especie de hongo implicada. La función de los cordones miceliares en el transporte de agua y nutrientes ha

sido investigada por varios autores (Duddridge et al. 1980; Brownlee et al. 1983; Read 1984; Finlay y Read 1986a, 1986b). En algunos tipos de cordones miceliares se diferencian conductos vasculares internos por lisis de los septos e incremento del diámetro de la hifa. Estas hifas no contienen citoplasma, consistiendo en tejido muerto similar al xilema de las plantas vasculares. La estructura y función de las rizomorfos con referencia a su papel en el transporte de agua han sido estudiados por Duddridge et al (1980).

Melin y Nilsson (1950, 1952, 1953, 1954, 1955) demostraron que existe un transporte de carbohidratos desde el huésped hacia el hongo. Asimismo, las hifas absorben nitrógeno, fósforo, potasio y calcio que transportan hacia el huésped. Posteriormente, Reid (1971) y Finlay y Read (1986a) demostraron que los carbohidratos pueden ser transportados a largas distancias a través de los cordones miceliares interconectados con raíces. De este modo, se suministran carbohidratos a otras micorrizas en formación a partir de micorrizas preexistentes.

La eficiencia de la absorción de nutrientes es incrementada por la presencia de ectomicorrizas (Finlay y Read 1986b). En las micorrizas que no poseen cordones miceliares, el manto es el responsable de la absorción de nutrientes desde el suelo (Harley y Smith 1983).

El nitrógeno es absorbido preferencialmente como amonio por el hongo (Mention y Plassard 1983). Los hongos implicados en la simbiosis también son capaces de captar aminoácidos como glutamato y glutamina entre otros (Abuzinadah y Read 1988).

La capacidad de captar amonio es importante en los bosques con suelos con bajo pH y bajas tasas de nitrificación. La gran superficie explorada por las hifas y cordones miceliares capacita a las ectomicorrizas para captar cantidades suficientes de amonio a pesar de la considerable inmovilidad de este elemento. Las micorrizas también aumentan la absorción de elementos más móviles como el nitrato, especialmente en zonas con bajo nivel de nitratos en suelo (Bledsoe y Zasoski 1983).

La absorción de fosfatos y su transporte por el simplasto en ectomicorrizas fue demostrada por Finlay y Read (1986b). La tasa de absorción de fósforo depende de la tasa de respiración y no puede ser intensificada por la tasa de transpiración. El fósforo se almacena como polifosfatos en las vacuolas fúngicas de los cordones miceliares y el manto. Los polifosfatos se acumulan en forma de gránulos metacromáticos y se movilizan cuando es necesario.

La transferencia de fósforo al huésped se supone que está interconectada con la transferencia de carbohidratos al hongo (Harley y Smith 1983), aunque no ha sido demostrada todavía la fosforilación de los azúcares (Smith y Smith 1986).

El potasio se absorbe con facilidad y se acumula en el manto (Harley y Wilson 1959). El calcio se puede encontrar en los gránulos de polifosfatos (Strullu 1982). Clement et al. (1977) demostraron que la excesiva absorción de calcio y potasio en suelos calcáreos es reducida por la micorrización.

Shemakhanova (1962) demostró la producción de vitaminas como la biotina, tiamina y ácido pantoténico por numerosos hongos ectomicorrícicos. Miller (1967) aisló citoquininas a partir de un filtrado de cultivos de *Rhizopogon roseolus*. La producción de compuestos indólicos (particularmente IAA) por hongos ectomicorrícicos en cultivo puro ha sido estudiada por Slankis (1958), Moser (1959b), Ulrich (1960), Gogala (1971), Gay et al (1985), Rovillon et al. (1986) y Ho y Trappe (1987).

Entre los efectos no nutricionales de las ectomicorrizas se encuentra el control biológico potencial contra patógenos (Marx 1969, 1972, 1973; Trappe 1977; Sinclair et al. 1982). Entre los mecanismos de protección implicados se encuentran la barrera física producida por las micorrizas (Marx 1973), producción de antibióticos (Marx 1973), producción de compuestos fungistáticos como isobutanol, ácido isobutírico, terpenos, fenoles y etileno (Marx 1973; Graham y Linderman 1980; Sampagni y Perrin 1985; Perry et al. 1987), cambios en los exudados de raíces micorrizadas que dificultan el

establecimiento de patógenos en la rizosfera (Marx 1973; Malajczuk y McComb 1977; Linderman 1988) y presencia de poblaciones microbianas en la rizosfera antagonistas al patógeno (Marx 1973; Malajczuk y McComb 1979; Linderman 1988).

1.4.3 Ecología de las Ectomicorrizas

La gran mayoría de plantas vasculares han evolucionado hacia la dependencia de las micorrizas para su supervivencia. A pesar de que su biomasa es relativamente pequeña, los hongos ectomicorrícicos son vitales para la absorción y acumulación de agua y nutrientes desde el suelo y de su translocación a la planta debido a sus altas tasas metabólicas y su distribución estratégicamente difusa en las capas más superficiales del suelo (Trappe y Fogel 1977). Los hongos ectomicorrícicos producen enzimas, hormonas, vitaminas y otros compuestos que influyen en el desarrollo de la raíz y la protegen contra los patógenos.

Los simbioses fúngicos, por otra parte, dependen de sus huéspedes para obtener compuestos carbonados, ya que tienen poca capacidad de descomponer la materia orgánica.

Harley (1973) realizó una estimación del consumo de carbono fotosintético por parte del componente fúngico de las ectomicorrizas a partir de datos de distintos autores, en la que se demostró que la demanda de fotosintatos por parte de los hongos ectomicorrícicos es considerablemente alta.

Fogel (1980) estimó que el 40 % de la incorporación anual de nitrógeno en un bosque de abeto de Douglas se debía a los hongos ectomicorrícicos, lo cual coincide con los resultados obtenidos en trabajos sobre fisiología de ectomicorrizas en los que se encontró que el manto fúngico funcionaba como un tejido de acumulación y almacenamiento, función que lleva a cabo el cortex en raíces no infectadas (Harley 1969).

El material fúngico rico en nutrientes, es aprovechado por insectos y otros pequeños animales micófagos que contribuyen a su diseminación. El micelio de los hongos es ingerido por animales tales como colémbolos y nemátodos, y sus cuerpos fructíferos (especialmente de hongos ectomicorrícicos) y esclerocios constituyen una importante fuente de alimento para algunos micromamíferos (Fogel y Trappe 1978). Aunque las actividades micófagas de los animales han sido consideradas como una contribución a la diseminación de esporas de hongos (especialmente hipogeos), posiblemente desarrollen otro papel importante en el ecosistema como la contribución a la rotura del eficiente ciclo cerrado de nutrientes en el sistema micorrícico y la redistribución de material rico en nutrientes como orina, heces o cadáveres en las distintas capas del suelo.

Existen dos aspectos de la estructura del ecosistema que resultan, al menos en parte, de los procesos originados en la rizosfera y que influyen directamente en los árboles: las interacciones entre plantas y la estructura del suelo (Perry et al. 1987).

Los hongos micorrícicos median directamente en las interacciones entre plantas al menos de tres formas: en primer lugar, permitiendo a los árboles competir con éxito con la vegetación herbácea por los recursos (Bowen 1980), pudiendo además detoxificar el suelo de agentes aleloquímicos producidos por estas plantas (Perry y Choquette 1987); en segundo lugar, disminuyendo la competencia entre plantas e incrementando la productividad de las combinaciones de especies, especialmente en suelos con limitaciones de fósforo (Perry et al. 1987); y, en tercer lugar, estableciendo uniones entre plantas de la misma o de distintas especies mediante hifas que actúan como rutas de transferencia de materiales (Brownlee et al. 1983; Read et al. 1985).

La consecuencia ecológica de la formación de este complejo social de organismos es el establecimiento de un sistema en el que el aporte de carbono por parte de las plantas huéspedes hacia el hongo sería efectuado

principalmente por los árboles adultos o dominantes. Este tipo de estructura favorece el establecimiento de plántulas bajo el dosel forestal en condiciones de sombra (Harley y Smith 1983).

Las micorrizas y otros microorganismos afectan a la formación del suelo y a sus características estructurales, produciendo compuestos húmicos (Tan et al. 1978), acelerando la descomposición de minerales primarios (Cromack et al. 1979) y produciendo sustancias adhesivas (polisacáridos extracelulares) que aglutinan partículas del suelo constituyendo agregados estables (Sutton y Sheppard 1976; Forster 1979; Tisdall y Oades 1979, 1982). Los dos primeros procesos son importantes en la fertilidad del suelo y en la nutrición de la planta. La formación de agregados influye en las propiedades del suelo, proporcionando una porosidad que permite, por un lado, el drenaje de agua y la aireación del suelo, y por otro, la retención de agua (Perry et al. 1987).

La formación de micorrizas es esencial en la revegetación de zonas con bajo contenido en nutrientes como las escombreras de minas (Schramm 1966; Marx 1976b), zonas áridas, bordes de carreteras, canteras, etc. Estas zonas presentan en general una baja proporción de propágulos de hongos simbioses, por lo que la producción de plantas inoculadas con hongos seleccionados es actualmente objeto de estudio (Trappe 1981).

1.4.4 Presencia de Ectomicorrizas en Viveros

La fumigación del suelo es una práctica rutinaria en muchos viveros forestales a raíz desnuda que elimina o reduce drásticamente la mayoría de la población microbiana en la capa más superficial del suelo (Mexal 1980, Le Tacon y Garbaye 1986). Los patógenos quedan de este modo eliminados, pero también muchos microorganismos beneficiosos como los hongos ectomicorrícicos. La recolonización es lenta y errática, pudiendo no ser satisfactoria si se introducen especies de hongos poco eficientes. La mayoría

de datos publicados (Richard 1975; Marx y Bryan 1975; Le Tacon 1982; Le Tacon y Garbaye 1986) muestran la necesidad de inoculación de viveros fumigados para favorecer el proceso de recolonización con hongos seleccionados.

Los viveros de contenedores presentan una tasa de infección con hongos ectomicorrícicos nativos muy errática debido a la dificultad de dispersión del hongo dentro del vivero. Las micorrizas más comunmente encontradas en viveros en contenedor americanos corresponden a los hongos *Endogone lactiflua*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris* (Landis et al. 1989). Entre los géneros que producen cuerpos fructíferos en vivero se encuentran *Inocybe*, *Laccaria*, *Thelephora* (Landis et al. 1989) y *Hebeloma* (Burdsall et al. 1986) principalmente asociados con abeto de Douglas y pinos. El hongo ectomicorrícico más abundante en viveros en contenedor es *Thelephora* spp., bien adaptado a las condiciones de vivero en donde se disemina con gran eficacia. Los cuerpos fructíferos de esta especie se forman a principios de verano y constituyen una fuente de inóculo para todo el vivero.

Una reciente prospección del estado micorrícico de plantas producidas en contenedor en viveros canadienses mostró una variación desde la ausencia de ectomicorrizas en el sistema radicular de *Pinus banksiana*, *P. contorta* y *Picea glauca* hasta su micorrización prácticamente total. La mayoría de micorrizas eran ectomicorrizas formadas por los hongos *Thelephora terrestris* y *Mycelium radialis atrovirens*. También se encontraron ectendomicorrizas formadas por un hongo del tipo "E-Strain" (*Complexipes*) (Danielson y Visser 1990).

La formación de ectendomicorrizas en viveros americanos es frecuente en el género *Pinus*, mientras que en otros géneros como *Abies* y *Pseudotsuga* la formación de ectendomicorrizas en viveros en contenedor es prácticamente inexistente (Landis et al. 1989).

Las plantas producidas en contenedor no micorrizadas generalmente

crecen bien si el suministro de agua y nutrientes solubles es adecuado. Sin embargo, la captación de agua y nutrientes después del trasplante a campo será efectiva únicamente cuando la planta se haya infectado por hongos ectomicorrícicos nativos. Se ha observado un retraso en el crecimiento y una reducción de la supervivencia en el trasplante de plantas no micorrizadas o micorrizadas con hongos comúnmente encontrados en viveros, en zonas que requieren un rápido establecimiento para la supervivencia (por ejemplo en zonas con sequía). El tiempo necesario para reemplazar los hongos del vivero por nativos mejor adaptados provoca un incremento de la mortalidad y la reducción del crecimiento inicial de la planta.

1.4.5 Selección de Hongos para Inoculación en Viveros

La selección de hongos ectomicorrícicos es un factor indispensable para obtener buenos resultados en un programa de inoculación (Mikola 1973; Trappe 1977; Harley y Smith 1983; Le Tacon y Bouchard 1986; Linderman 1987).

La selección de hongos ectomicorrícicos requiere la consideración de criterios ecofisiológicos y operacionales. Entre los primeros cabe destacar la capacidad de colonizar las raíces cortas de la planta huésped y la extensión del potencial de absorción del sistema radicular a través de la ramificación de la raíz o el desarrollo de una fase miceliar extramatricial. Otros criterios ecofisiológicos importantes son: adaptabilidad al vivero y a la zona de trasplante (Laiho 1970; Theodorou y Bowen 1971), tolerancia a la sequía (Trappe 1977), tolerancia a la toxicidad y pH del suelo (Trappe 1962b; Laiho 1970; Marx 1976b; Trappe 1977; Hung y Trappe 1983), capacidad para captar nutrientes y descomponer compuestos orgánicos (Laiho 1970; Bowen 1973; Ho y Trappe 1980; Ho 1987) y producción de reguladores del crecimiento (Bowen 1973; Slankis 1973).

Desde un punto de vista operativo, el hongo debería ser capaz de

crecer rápidamente en cultivo puro y colonizar rápidamente las plantas tras la inoculación. Resulta esencial que el hongo resista la manipulación necesaria que comporta el manejo del vivero y que permanezca infectivo tras un período de almacenamiento, transporte, incorporación al sustrato del vivero y cultivo de la planta (Kropp y Langlois 1990).

Finalmente, cabe remarcar que la variación ecotípica en hongos ectomicorrícicos puede ser tan marcada como las diferencias entre especies. La procedencia del hongo debe ser considerada junto con la procedencia de la semilla. Sin embargo, incluso dentro de la misma zona de procedencia pueden encontrarse diferencias en una gran variedad de características (Trappe 1962b; Laiho 1970).

1.4.6 Inoculación Artificial en Viveros

Para asegurar una buena micorrización en plantas producidas en viveros, se deben desarrollar procedimientos para la inoculación con hongos específicos y perfeccionar el suministro de nutrientes y agua para adaptar el manejo del vivero a las condiciones necesarias para el mantenimiento de la simbiosis planta-hongo (Ruehle y Marx 1977; Trappe 1977).

El inóculo natural que ha sido más extensamente usado, especialmente en países poco desarrollados, es suelo o humus conteniendo micorrizas y micelio asociado (Mikola 1973). Esta forma de inóculo puede ser recolectado en bosques o plantaciones establecidas y su aplicación puede hacerse mezclando el inóculo con el sustrato del vivero, extendiendo una capa sobre las camas del vivero y regando a continuación o mediante suspensión del suelo en agua y vertido sobre las plántulas. Los mejores resultados se obtienen a partir de suelo fresco.

El mayor inconveniente de este procedimiento es el de no poder controlar las especies de hongos introducidas que pueden no ser adecuadas para la zona de transplante. Además, el suelo puede contener

microorganismos perjudiciales o malas hierbas que pueden afectar a la plantación. Por otro lado, se requiere el manejo de grandes cantidades de inóculo, lo cual hace desaconsejable su uso a gran escala.

Otro procedimiento relacionado es el de utilizar plántulas infectadas o ectomicorrizas recogidas a partir de plantaciones establecidas. El micelio extramatricial desarrollado a partir de las micorrizas de las plantas infectadas se desarrolla rápidamente e infecta a otras plántulas (Mikola 1973). El procedimiento consistente en la utilización de ectomicorrizas recolectadas de plantaciones ha sido utilizado únicamente en condiciones experimentales (Levisohn 1956) por la dificultad que conlleva la obtención de cantidades suficientes de inóculo.

El inóculo a partir de esporas se ha utilizado para desarrollar micorrizas específicas con hongos conocidos. Los primeros intentos de inoculaciones con esporas se desarrollaron en el siglo XVIII mediante la aplicación de esporocarpos de trufas en agujeros practicados debajo de robles en plantaciones para asegurar la producción de trufas (Trappe 1977).

Los Gasteromicetes, entre los que se encuentran géneros como *Rhizopogon*, *Scleroderma* y *Pisolithus*, producen numerosas basidiosporas fáciles de recolectar en grandes cantidades. Las esporas se recolectan tras la desecación de los esporocarpos y se aplican espolvoreando o mediante agua de riego (Ruehle 1980a; Castellano et al. 1985). En otras ocasiones, el inóculo de esporas se mezcla con un carrier húmedo (vermiculita o arena) y se aplica sobre el sustrato (Marx et al. 1976; 1978). Otra técnica utilizada es el recubrimiento de las semillas con esporas mediante la mezcla de semillas y esporas en agua (Theodorou 1971). Una variante de este método consiste en mezclar las esporas con una matriz de arcilla o adhesivo que se utiliza para recubrir o "peletizar" la semilla con el grosor adecuado para evitar la inhibición de la germinación de ésta (Marx et al. 1984a). La adición de fungicidas adecuados (captan, benomyl o thiram) puede evitar la infección de la semilla con microorganismos patógenos derivados de la utilización de

esporas obtenidas de esporocarpos demasiado maduros o rotos (Marx y Kenney 1982).

La falta de tests de laboratorio para determinar la viabilidad de las esporas es uno de los inconvenientes de su utilización debido a la dificultad de germinar las esporas en el laboratorio. Por otro lado, la obtención de esporocarpos depende de su abundancia estacional, y no todas las especies producen esporocarpos con un número elevado de esporas para hacer aplicable su uso como inóculo.

El problema más significativo en el uso de esporas como inóculo es la falta de definición genética. La combinación de esporas recolectadas de diferentes basidiocarpos asociados a huéspedes diferentes o en áreas geográficas distintas puede ocasionar una alta variabilidad en la capacidad de formación de micorrizas.

La utilización de inóculo vegetativo o miceliar fue iniciada en Austria por Moser (1958, citado por Marx (1980)) a partir de cultivos líquidos de *Suillus plorans* mantenidos bajo aireación y transferidos posteriormente a un substrato sólido de turba humedecida con solución nutritiva fresca. Esta metodología ha sido la base para investigaciones posteriores sobre la producción de inóculo (Marx y Bryan 1975; Marx et al. 1978; Mitchell et al. 1984; Hung y Molina 1986b; Le Tacon y Bouchard 1986). Esta técnica requiere condiciones asépticas estrictas y ofrece buenos resultados para hongos que crecen bien en cultivo. La aplicación a gran escala de este tipo de inóculo ya ha sido realizada con éxito para *Pisolithus tinctorius* (Marx et al. 1982, 1984b). Los resultados obtenidos indican que se puede obtener inóculo viable de *Pisolithus tinctorius* mediante procedimientos de fermentación industrial y ser utilizado para la formación de ectomicorrizas en viveros de diversas especies arbóreas de interés forestal. La utilización y comercialización de otras especies de hongos está en fase de desarrollo, tanto en Norteamérica como en Europa.

Otra técnica que ha resultado eficaz en la producción de inóculo es la

inclusión del hongo en una matriz de polímeros (Le Tacon et al. 1983). Mediante esta técnica, se ha conseguido una mayor resistencia del inóculo en el suelo bajo condiciones ambientales desfavorables.

1.4.7 Efecto de las Ectomicorrizas en Plantación

El test crítico para determinar el éxito de la inoculación con hongos ectomicorrícicos es el comportamiento de la planta en el campo (Marx 1980). La inoculación puede no producir un incremento de crecimiento en vivero pero debe proporcionar a las plantas una mayor oportunidad de sobrevivir o crecer mejor tras el trasplante. Stenström et al. (1985) detectaron una disminución inicial en el crecimiento de *Pinus sylvestris* inoculado en vivero con distintos hongos ectomicorrícicos, aunque a partir del segundo año en plantación el volumen de las plantas micorrizadas en vivero superó a los controles no inoculados en un porcentaje entre el 20 y el 75 %. La respuesta en campo a la inoculación difiere según el hábitat y la naturaleza de los hongos y plantas hospedadoras implicadas (Dixon 1986).

Los ejemplos más destacados del efecto beneficioso de la inoculación con hongos ectomicorrícicos en el establecimiento de plantaciones se encuentran en los intentos de aforestación de zonas desprovistas de árboles (Mikola 1970), o carentes de inóculo natural apropiado a la especie que se introduce (Vozzo y Hacskaylo 1971). Igualmente, la alteración del hábitat puede ocasionar la desaparición del inóculo nativo, con lo que la inoculación con hongos ectomicorrícicos es imprescindible para las posibilidades de establecimiento de las plantaciones. Es éste el caso de la recuperación de escombreras de minas de carbón (Schramm 1966) y la reforestación de zonas afectadas por fuego o talas masivas (Marx 1980), o desprovistas de árboles durante largos períodos de tiempo como praderas y zonas de uso agrícola (Shemakhanova 1962; Mikola 1973; Molina y Trappe 1982c).

El efecto beneficioso de la inoculación con hongos ectomicorrícicos en

plantaciones de zonas de reforestación rutinaria no alteradas también ha sido constatado (Shemakhanova 1962; Mikola 1973; Trappe 1977; Marx 1977a, 1980; Le Tacon 1982; Molina y Chamard 1983; Marx y Cordell 1987, 1988), aunque los resultados no son consistentes. La respuesta de crecimiento varía con las características del suelo y el tipo de inóculo utilizado (Danielson 1988; Le Tacon et al. 1988; Marx y Cordell 1988; Navratil 1988).

Los resultados obtenidos en plantaciones de abeto de Douglas inoculados con distintos hongos ectomicorrícicos han proporcionado resultados variables. Los efectos positivos en la estimulación del crecimiento en campo han sido observados por Castellano y Trappe (1985) y Le Tacon et al. (1988) mientras que Bledsoe et al. (1982) detectaron un efecto depresor del crecimiento en plantas inoculadas de abeto de Douglas que atribuyeron a un inóculo inadecuado.

En las zonas de reforestación rutinarias pueden encontrarse comunidades numerosas de hongos simbiotes (Kropp 1982). Sin embargo, las poblaciones de estos hongos pueden fluctuar temporalmente debido a prácticas silvícolas detriminales como talas masivas no seguidas por repoblaciones, o por el fuego (Harvey et al. 1980; Persson 1982; Parke et al. 1984; Perry et al. 1987). Los fuegos controlados no provocan un incremento de las temperaturas del suelo suficientemente alto como para eliminar a los hongos micorrícicos (Mikola et al. 1964). En los últimos años se han desarrollado hipótesis que postulan la existencia de una sucesión de especies de hongos ectomicorrícicos relacionada con la sucesión de especies arbóreas en el bosque (Mason et al. 1983; Dighton y Mason 1985; Mason et al. 1985; Dighton 1987). Los hongos pertenecientes a las etapas maduras de la sucesión ("late-stage fungi") no colonizarían los sistemas radiculares de las plantas jóvenes o lo harían en menor grado que los hongos correspondientes a la fase temprana de la sucesión ("early-stage fungi") (Dighton y Mason 1985; Danielson 1988; Marx y Cordell 1988). Estas hipótesis necesitan una verificación experimental en diversos ecosistemas para corroborar la

universalidad del fenómeno.

La inoculación de plantas destinadas a plantaciones regulares se justifica en aquellas situaciones en las que el comportamiento de la planta inoculada sea notablemente superior al de la planta no inoculada. De este modo, podemos considerar tres tipos de zonas que pueden beneficiarse de la introducción de plantas inoculadas:

1. **zonas con algún tipo de estrés ambiental**, como las que se encuentran alteradas por el hombre, entre las que se encuentran las escombreras de minas o zonas altamente erosionadas (Schramm 1966; Marx 1977a, 1980; Marx y Ruehle 1989).

2. **zonas con bajas poblaciones de hongos ectomicorrícicos nativos**, que generalmente han estado deforestadas durante un largo período de tiempo (Shemakhanova 1962; Mikola 1970).

3. **zonas donde se introducen especies exóticas** que requieren la presencia de determinados hongos ectomicorrícicos (Vozzo y HacsKaylo 1971). Las especies forestales de crecimiento rápido pueden beneficiarse del incremento del crecimiento inicial promovido por el hongo simbiote, que puede mantenerse durante varios años (Marx y Cordell 1988).

2. SELECCION DE HONGOS ECTOMICORRICICOS

El objetivo de este capítulo es la obtención de una colección de cultivos puros de hongos ectomicorrícicos y la selección de estos hongos para su posterior aplicación en inoculaciones de vivero. La primera parte se dedica a la recolección, identificación y aislamiento de los hongos ectomicorrícicos que fructifican en una plantación de abeto de Douglas de unos 40 años de edad. Igualmente, se obtendrán aislamientos a partir de esporocarpos asociados a otras especies arbóreas.

En la selección de aislamientos para su uso como inóculo, se considera su existencia en la zona ecológica donde se introducirá posteriormente y, por tanto, su potencial adaptación a las condiciones de clima y suelo existentes, así como la facilidad de crecimiento en cultivo puro y su capacidad de formación de ectomicorrizas.

Los resultados obtenidos en este capítulo se utilizarán para la determinar los aislamientos que se utilizarán posteriormente en la producción de inóculo vegetativo, para la inoculación de plantas de abeto de Douglas producidas en contenedor.

2.1 HONGOS ASOCIADOS AL ABETO DE DOUGLAS

El abeto de Douglas es una de las coníferas más estudiadas desde el punto de vista de sus asociaciones micorrícicas. Trappe (1977) estimó que existen unas 2000 especies de hongos potencialmente micorrícicas de esta especie. Algunas de ellas parecen ser específicas y otras se asocian con otros géneros y familias de plantas (Trappe 1962a).

La dependencia de las especies forestales, tanto arbóreas como componentes del sotobosque, de la simbiosis micorrícica ha sido sobradamente demostrada (Harley y Smith 1983). La introducción de especies

arbóreas exóticas debe considerar la existencia de hongos nativos micorrícicos, y la posibilidad de la introducción de hongos simbioses asociados en caso de no existir aquellos (Bowen 1973). En este sentido, cabe destacar los repetidos fracasos en la reforestación con especies de pinos exóticos en zonas carentes de hongos ectomicorrícicos adecuados en el hemisferio sur e islas tropicales (Briscoe 1959; Mikola 1970; Vozzo y Hacskaylo 1971).

El inventario de la microflora fúngica ectomicorrícica natural y su evolución tras la desaparición de los árboles y después de la introducción de nuevas especies arbóreas forestales, son estudios indispensables para la comprensión de los problemas que aparecen durante las primeras fases de la plantación (Bonneau 1972).

Los hongos asociados a especies arbóreas introducidas pueden tener tres orígenes (Le Tacon et al. 1984):

- micelio, esporas u otras formas de resistencia (cordones miceliares, esclerocios) preexistentes en el suelo.
- esporas aportadas por el viento o animales, procedentes de otras poblaciones arbóreas más o menos alejadas.
- inóculo aportado en forma de micorrizas y procedente del vivero de origen.

Le Tacon et al. (1984) estudiaron la recolonización de plantas de *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies* trasplantadas en la región del Limousin (Francia) en tres tipos de zonas: previamente ocupadas por coníferas, previamente ocupadas por caducifolios y landas de *Calluna* sp. y de helechos. En las dos zonas previamente forestadas, las plantas se micorrizaban rápidamente y la crisis de trasplante no duraba más de uno o dos años. En el caso de las landas, la reconstitución del sistema ectomicorrícico llegaba a durar hasta 15 años (en el caso de landas de

Calluna sp.) por la falta de simbiosis en el suelo y la sensibilidad de muchos hongos a los exudados de *Calluna* sp.

La mayoría de inventarios sobre hongos ectomicorrícicos que fructifican en plantaciones europeas se ha realizado sobre hongos epigeos, prestando poca o nula atención a los hongos hipogeos que fructifican en el subsuelo. La importancia de este grupo de hongos como formadores de micorrizas (Trappe 1962a, 1971; Miller 1983; Trappe y Molina 1986; Castellano et al. 1989) justifica su consideración en la selección de hongos candidatos para inoculaciones artificiales en viveros. La especificidad de muchas especies de hongos hipogeos hacia determinados huéspedes (Molina y Trappe 1982a), hace que su presencia se asocie únicamente a determinadas especies arbóreas.

Los estudios realizados en Estados Unidos muestran la relativa abundancia de hongos hipogeos que fructifican en distintas poblaciones de coníferas (24 especies con *Pinus ponderosa* (States 1983, 1984), 22 especies con *Abies grandis* (Terwilliger 1985), 47 especies con abeto de Douglas (Luoma et al. 1991)). Los estudios sobre hongos hipogeos en España fueron iniciados por Lázaro Ibiza en 1908. La última revisión del catálogo de hongos hipogeos en España ofrece un total de 85 especies, de las que 28 especies en 11 géneros han sido encontradas en zonas potencialmente plantables con abeto de Douglas (Alvarez et al. 1992). El escaso número de especies de hongos hipogeos reportados para Europa puede deberse a la falta de atención a su estudio, pero también a otros factores como el impacto sostenido que ha tenido el hombre sobre el medio natural con consecuencias perjudiciales para los organismos vectores de estos hongos, la relativa baja diversidad de especies arbóreas y la evolución climática que tuvo lugar en Europa.

La obtención de datos sobre hongos hipogeos requiere realizar recolecciones durante un período largo de tiempo. La dificultad añadida de la toma de muestras y la identificación ha limitado los estudios cuantitativos o

taxonómicos sobre este grupo de hongos (Hunt y Trappe 1987). En este capítulo se presentan los resultados de la recolección sistemática de hongos epigeos e hipogeos asociados a una plantación de abeto de Douglas para su utilización posterior en inoculaciones de vivero.

2.1.1 Material y Métodos

Durante cinco años (1987-91) se ha realizado un seguimiento de los hongos ectomicorrícicos que fructifican en una parcela de abeto de Douglas de unos 40 años situada en el Parque Natural del Montseny (Barcelona / Girona), con el objetivo de obtener hongos potencialmente simbiotes de abeto de Douglas, tanto epigeos como hipogeos, para su uso en inoculaciones. La parcela de recolección está situada a unos 1.100 m. de altitud y tiene un suelo arenoso con un pH de 5.5 (el análisis del suelo se detalla en la Tabla 4.b. (Suelo Douglas)). La vegetación arbórea circundante está compuesta casi exclusivamente por *Fagus sylvatica* y *Abies* spp. El sotobosque de la parcela de recolección es muy escaso debido a la densidad de la plantación, y esta constituido únicamente por plantas herbáceas.

La prospección de la parcela se ha realizado en las principales épocas de formación de esporocarpos (primavera y otoño) mediante observación visual para la recolección de hongos epigeos y con la ayuda de un rastrillo para los hongos hipogeos, cuidando de volver a reponer el mantillo tras la exploración de cada zona.

Los esporocarpos recolectados fueron identificados y se intentó el aislamiento del hongo en medio MMN modificado (Marx 1969). Paralelamente, se secaron los esporocarpos a 40°C con el fin de mantener viables las esporas para su utilización posterior como inóculo.

2.1.2 Resultados y Discusión

En total se recolectaron 21 especies de hongos considerados como ectomicorrícicos (según Trappe (1962a)), de las cuales 15 corresponden a hongos epigeos y 6 a hongos hipogeos (Tabla 2.1.(a)). El número total de especies de hongos hipogeos recolectados es significativamente bajo si lo comparamos con las especies fúngicas que fructifican en el Parque (alrededor de 700 según revisión de Girbal (1986)). Sin embargo, es de destacar que la totalidad de las especies de hongos hipogeos recolectadas no habían sido previamente citadas. La aparición regular y abundante de este grupo de hongos denota su importancia funcional relativa en el ecosistema. La dispersión de estos hongos se realiza por la ingestión de esporocarpos por parte de micromamíferos e insectos principalmente (Maser et al. 1978; Maser et al. 1985; Malajczuk et al. 1987; Blaschke y Bäumlér 1989). En este sentido, se observaron numerosas excavaciones en el suelo de la plantación durante la época de producción de esporocarpos, probablemente debidas a la búsqueda de hongos hipogeos como fuente de alimento.

Un total de cuatro especies de hongos hipogeos (*Hymenogaster vulgaris*, *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon subareolatus* y *Tuber maculatum*) mostraron una aparición regular y abundante, constituyendo la mayor parte de la producción. En la Figura 2.1.(a) se representa el número de esporocarpos recolectados de cada una de las cuatro especies de hongos hipogeos dominantes durante el período 1989-91 (años en los que la recolección fue sistemática). La aparición de esporocarpos de hongos hipogeos se detecta sobre todo en los meses de octubre y noviembre de cada año, coincidiendo con la fructificación de hongos epigeos. La producción de esporocarpos en primavera ocurre en todas las especies entre abril y junio, aunque en número muy escaso. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Luoma et al. (1991) en bosques de abeto de Douglas en Oregon, donde la producción de esporocarpos de hongos

TABLA 2.1.(a)

Especies de hongos asociados a *Pseudotsuga menziesii* recolectados en una plantación de 40 años situada en el Parque Natural del Montseny (Girona) durante los años 1987-1991.

(*) : A-xxx : Número de aislamiento en colección

(+) : No se dispone de aislamiento pero la especie puede aislarse en cultivo puro

(-) : No ha podido aislarse en cultivo puro

ESPECIES Y AUTORIDADES	AÑO COLECCION	AISLAMIENTO (*)
Hongos epigeos		
<i>Amanita citrina</i> (Schff.)S.F. Gray	1990	A-145
<i>A. muscaria</i> (L. ex Fr.)Hooker	1991	(+)
<i>A. pantherina</i> (DC ex. Fr.)Secr.	1990	A-149
<i>Boletus pulverulentus</i> Opat.	1990	A-146
<i>Clitocybe gibba</i> (Pers. ex Fr.)Kummer	1990-91	(+)
<i>Hebeloma</i> sp.	1991	(+)
<i>Laccaria amethystina</i> (Bolt. ex Hooker)Murr.	1991	(+)
<i>Laccaria</i> sp.	1990	(+)
<i>Macrolepiota procera</i> (Scop. ex Fr.)Sing.	1988	(+)
<i>M. rhacodes</i> (Vitt.)Sing.	1991	(+)
<i>Scleroderma verrucosum</i> Vaill. ex Pers.	1990	A-152
<i>Thelephora terrestris</i> (Ehrh.)Fr.	1990	(+)
<i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.)Ricken	1988	(-)
<i>T. saponaceum</i> (Fr.)Kummer	1988	A-121
<i>Xerocomus chrysenteron</i> (Bull. ex St. Am.)Quél.	1988, 1990	A-119, A-147
Hongos hipogeos		
<i>Hymenogaster vulgaris</i> Tul.	1989-91	(-)
<i>Melanogaster ambiguus</i> (Vitt.)Tul.	1989-91	A-132
<i>Rhizopogon subareolatus</i> Smith	1987-91	A-116, A-118
<i>Tuber levissimum</i> Gilkey	1989-90	(-)
<i>T. maculatum</i> Vitt.	1989-91	(-)
<i>T. rufum</i> Pico ex Fr.	1989	(-)

hipogeos se produjo principalmente en primavera, a diferencia de los hongos epigeos que fructificaron en otoño. Las fructificaciones de hongos hipogeos observadas en la parcela de recolección fueron abundantes en los años 1989 y 1991, decreciendo sensiblemente en 1990.

El mayor número de esporocarpos encontrados correspondió a *Rhizopogon subareolatus*, aunque todas las especies fructificaron en mayor o menor grado durante los tres años de prospección. Esta especie pertenece a la sección *Villosuli* que comprende especies consideradas específicas de abeto de Douglas (Molina y Trappe 1982a), por lo que su introducción posiblemente se produjo a partir de plantas ya inoculadas en el vivero de origen. El resto de las especies de hongos epigeos e hipogeos recolectados no muestran especificidad hacia abeto de Douglas.

La mayoría de los géneros de hongos recolectados pueden asociarse también con *Fagus sylvatica* (Trappe 1962a) que es la especie arbórea dominante de la zona. Según Le Tacon et al. (1984), la presencia previa de *Fagus sylvatica* en una zona de plantación permite disponer de un grupo de simbiontes no específicos que pueden asociarse posteriormente a *Pseudotsuga menziesii*.

La falta de disponibilidad de suficientes esporas de hongos ectomicorrícicos, es uno de los factores limitantes en su utilización como inóculo (Marx 1980). Sin embargo, la regularidad de fructificación de los hongos hipogeos y su elevada producción de esporas por esporocarpo, pueden hacer viable su uso en la inoculación de viveros.

2.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HONGOS ECTOMICORRICICOS

El desarrollo de determinadas áreas de investigación sobre las ectomicorrizas ha sido posible gracias a la posibilidad de aislamiento y manipulación experimental de los hongos ectomicorrícicos. Los estudios *in vitro* de aislamientos han proporcionado información sobre procesos

biológicos básicos de los hongos ectomicorrícicos tales como los requerimientos fisiológicos de crecimiento, producción de enzimas y hormonas, interacciones con microorganismos patógenos y pautas de especificidad (Molina y Palmer 1982).

Los hongos ectomicorrícicos se aíslan normalmente del tejido del esporocarpo, aunque también pueden obtenerse a partir de ectomicorrizas desinfectadas superficialmente (Zak y Bryan 1963; Zak y Marx 1964; Zak 1971, 1973; Chu-Chou 1979), de esclerocios (Trappe 1969), y, en algún caso, de esporas sexuales (Fries 1978, 1981; Fries y Birraux 1980).

Todos los aislamientos utilizados en este trabajo, excepto los aislamientos de *Cenococcum geophilum* que provienen de micorrizas y esclerocios, se obtuvieron de aislamientos a partir de esporocarpos siguiendo la técnica descrita por Molina y Palmer (1982). Según esta técnica, los esporocarpos se recogen preferiblemente jóvenes y en buen estado. A continuación se identifican y se limpian cuidadosamente con un pincel en seco para quitar el suelo adherido. Seguidamente, en cámara de flujo laminar (o en una cámara lo más limpia y aislada posible si se realiza en campo) se practica una incisión longitudinal de 1-2 mm de profundidad a lo largo de la superficie del sombrero y a lo largo del pie en el caso de que el esporocarpo pertenezca a los Agaricales, o rodeando el esporocarpo en el caso de los Gasteromicetos. La incisión debe realizarse con un bisturí desinfectado. A continuación se separan las dos mitades del esporocarpo divididas por el corte, utilizando la presión de los dedos. De este modo, queda al descubierto tejido no expuesto al exterior ni contaminado por el bisturí. De este tejido no expuesto se toma un fragmento utilizando un instrumento, previamente flameado y enfriado, que puede ser una aguja o unas pinzas. Seguidamente, se siembra el tejido en tubos o placas conteniendo medio nutritivo agarificado.

Los intentos de aislamiento deben hacerse de varios puntos del esporocarpo, ya que existen zonas a partir de las cuales es más fácil obtener el cultivo. Las zonas que han proporcionado mejores resultados para realizar

aislamientos son: la parte inmediatamente superior a las láminas en Agaricales, y el centro de la gleba en hongos hipogeos.

La obtención de aislamientos para establecer la colección de cultivos, se ha realizado sistemáticamente desde 1987. El número de intentos de aislamiento para cada colección de esporocarpos perteneciente a una especie de hongo, ha sido en promedio de 10. Las siembras se han realizado en tubos de vidrio de 90 x 13 mm. tapados con tapón de rosca y conteniendo 3 ml. de medio Melin Norkrans modificado (en adelante MMN) (Tabla 2.2.(a)). Esta formulación corresponde a un medio semisintético, inicialmente creado por Norkrans (1949) como un medio sintético, y posteriormente modificado por Marx (1969).

La aparición de micelio tras la siembra se puede observar en 2-3 días o, por el contrario, se puede producir a los 20-30 días dependiendo del hongo que se trata de aislar. Cuando el micelio en crecimiento se extendió por el agar, se tomó un fragmento de la zona de crecimiento y se transfirió a tubos con medio fresco. A continuación se les asignó un número de cultivo y, cuando el crecimiento era visible, se introdujeron en la colección de cultivos. Los ejemplares a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos se secaron a 40°C, asignándoles un número de herbario para futuras referencias y comprobaciones (Ammirati 1979). Los datos de recolección de cada esporocarpo (fecha, localidad, elevación y orientación de la zona, tipo de suelo y pH, vegetación acompañante, etc.) se archivaron junto a los números de herbario y de cultivo en una base de datos.

La colección de cultivos se mantiene refrigerada a 5°C para evitar un crecimiento rápido y una transferencia frecuente a medio fresco. En estas condiciones, se realiza la transferencia de toda la colección de cultivos cada 3 meses. Actualmente se dispone de una colección de unos 100 aislamientos de hongos potencialmente ectomicorrícicos. Los géneros de hongos ectomicorrícicos que han podido aislarse en cultivo puro en MMN y se mantienen regularmente en colección son *Amanita*, *Boletus*,

Cenococcum, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lyophyllum*, *Melanogaster*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Thelephora* y *Xerocomus*.

TABLA 2.2.(a)

Composición del medio Melin Norkrans (MMN) según Marx (1969) modificado por Molina y Palmer (1982).

NUTRIENTES	MMN (AGAR)	MMN (LIQUIDO)
CaCl ₂	0.050 g.	0.050 g.
NaCl	0.025 g.	0.025 g.
KH ₂ PO ₄	0.500 g.	0.500 g.
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.250 g.	0.250 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.150 g.	0.150 g.
Sequestrene (Geigy)	0.020 g.	0.020 g.
Thiamina HCl	100 µg.	100 µg.
Extracto de Malta	3.000 g.	-
Glucosa	10.000 g.	2.500 g.
Agar	15.000 g.	-
Agua destilada	Hasta 1000 ml.	Hasta 1000 ml.
HCl 2%	Acidificar a pH 5.5	Acidificar a pH 5.5

Los géneros que presentan mejor crecimiento en cultivo puro son *Laccaria*, *Lyophyllum*, *Rhizopogon*, *Suillus*, *Thelephora* y *Xerocomus*. Los géneros *Amanita*, *Cenococcum* y alguna especie de *Hebeloma* crecen bien aunque lentamente. Los géneros *Paxillus*, *Pisolithus* y *Scleroderma* requieren transferencias a medio fresco

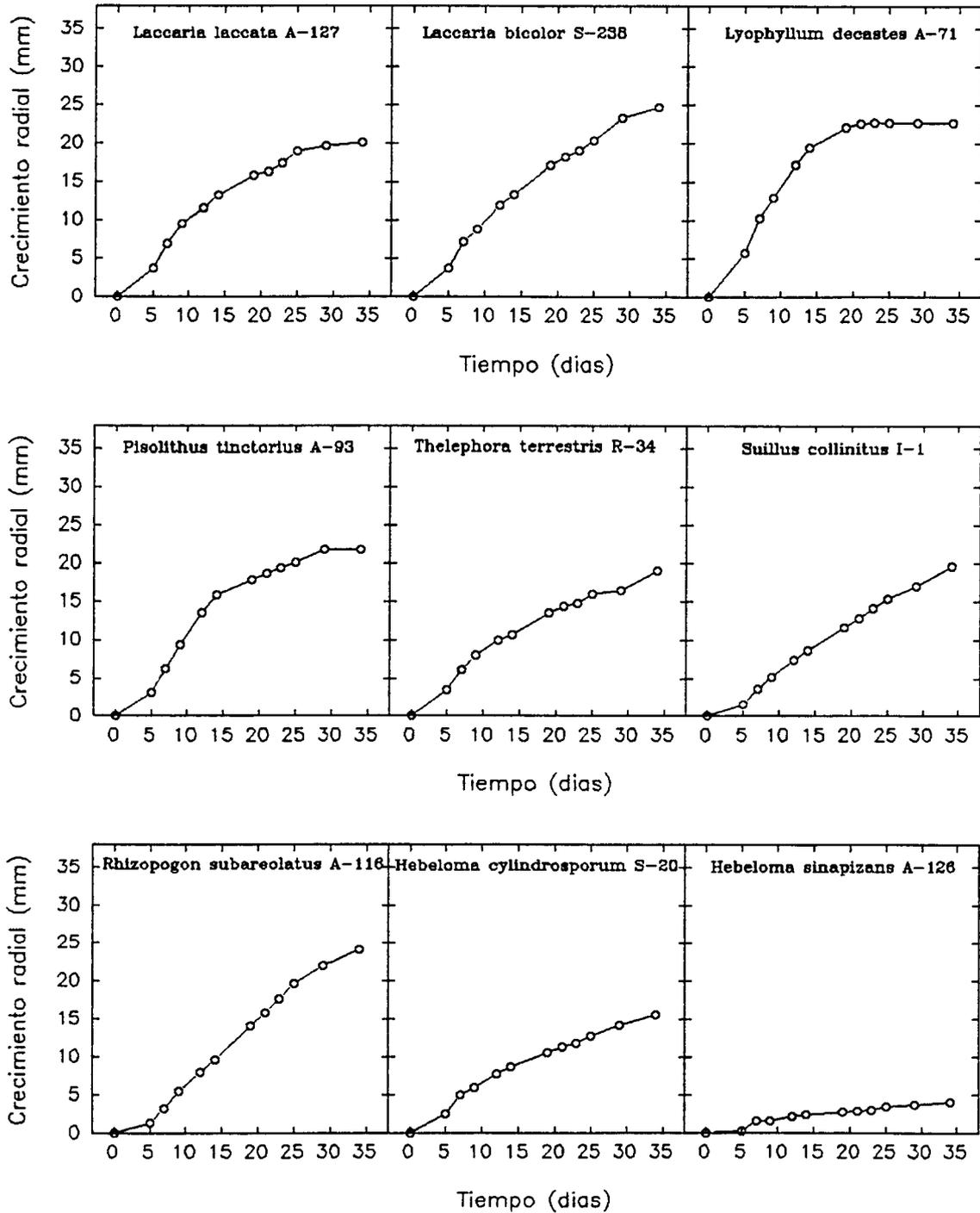
frecuentes, posiblemente por la abundante producción de metabolitos que pueden llegar a resultar autotóxicos en el medio.

En la Figura 2.2.(a) se representa el crecimiento radial en placa de 9 aislamientos de hongos ectomicorrícicos de la colección de cultivos, durante un período de 35 días en medio MMN. El crecimiento de *Lyophyllum decastes* y *Pisolithus tinctorius* muestra un rápido inicio y una fase de parada del crecimiento a partir de 20-25 días, posiblemente debida al exceso de metabolitos en el medio. Este factor debe tenerse en cuenta durante la producción de inóculo miceliar para evitar la posible pérdida de efectividad del hongo tras períodos de incubación del inóculo excesivamente largos. *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *Rhizopogon subareolatus*, *Suillus collinitus* y *Thelephora terrestris* crecieron rápidamente y mantuvieron la tendencia al crecimiento después de 35 días en placa. *Hebeloma cylindrosporum* y, sobre todo, *H. sinapizans* crecieron más lentamente aunque de manera constante durante todo el período de crecimiento.

Entre los hongos que se han perdido con relativa facilidad tras sucesivas transferencias, se encuentran aislamientos de *Boletus*, *Lactarius* y *Melanogaster*, todos ellos con crecimiento muy lento. Otros géneros no han podido ser aislados aunque se han realizado repetidos intentos. Entre éstos se encuentran *Balsamia*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Elaphomyces*, *Genea*, *Hydnum*, *Hymenogaster*, *Hysterangium*, *Russula*, *Terfezia* y *Tuber*. La ausencia de aislamientos de éstos y otros géneros de hongos ectomicorrícicos se debe, probablemente, a la falta de conocimientos sobre los requerimientos nutritivos que obtienen de las plantas huéspedes y que no se encuentran en los medios de cultivo más frecuentemente utilizados para el aislamiento de hongos ectomicorrícicos (Molina y Palmer 1982).

FIGURA 2.2.(a)

Crecimiento radial en medio MMN de nueve aislamientos de hongos ectomicorrícicos mantenidos en placa a 25°C durante 35 días.



2.3 SINTESIS DE ECTOMICORRIZAS EN CULTIVO PURO

El objetivo de este estudio es la determinación de la capacidad simbiótica de hongos supuestamente ectomicorrícicos a partir de una colección de aislamientos obtenida, mayoritariamente, a partir de esporocarpos recolectados en distintas zonas ecológicas, y asociados a diferentes especies arbóreas. La información obtenida permitirá la selección de aquellos aislamientos que formen un elevado porcentaje de micorrizas con abeto de Douglas para su posterior utilización en inoculaciones artificiales en condiciones de vivero.

La técnica de síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro fue desarrollada inicialmente en los trabajos de Melin (1921, 1922, 1923, 1936, citados por Molina y Palmer (1982)) para demostrar experimentalmente la capacidad de formación de ectomicorrizas de determinados aislamientos fúngicos con hospedadores específicos en condiciones axénicas. La información obtenida en este tipo de ensayos ha servido para complementar las observaciones de campo de las asociaciones hospedador-hongo (Trappe 1962a) y ha permitido el estudio de aspectos fisiológicos importantes de la simbiosis en condiciones controladas. Entre estos cabe citar la absorción de nutrientes y agua por parte del hongo simbiote y su traslocación al hospedador (Duddridge et al. 1980; Melin y Nilsson 1950, 1958), el movimiento de fotosintatos desde el hospedador al hongo (Melin y Nilsson 1957), la producción de reguladores del crecimiento (Graham y Linderman 1980; Slankis 1973), la transferencia de carbohidratos entre hospedadores vía hifas fúngicas (Reid y Woods 1969), la protección frente a patógenos de la raíz (Marx y Davey 1969), los efectos de la temperatura en el desarrollo de las micorrizas (Marx et al. 1970) y la especificidad y compatibilidad entre hongo y hospedador (Molina 1979a, 1981; Molina y Trappe 1982a) entre otros procesos.

Los resultados obtenidos mediante este procedimiento deben ser

interpretados dentro del contexto de artificialidad de las condiciones experimentales, limitando la extrapolación de los resultados a las condiciones naturales. Los resultados positivos son conclusivos para confirmar la capacidad de una combinación particular hospedador-hongo para formar ectomicorrizas. Los resultados negativos, sin embargo, sugieren que la unión de los organismos es improbable aunque el resultado no puede considerarse como definitivo. De cualquier modo, un resultado positivo debe confirmarse con la observación microscópica para confirmar la penetración intercelular del hongo en el córtex radicular (Molina y Palmer 1982).

La metodología desarrollada inicialmente por Melin (1921) utilizaba recipientes conteniendo arena estéril humedecida con solución nutritiva. En su interior se introducía una semilla germinada asépticamente y un cultivo fúngico. Posteriormente, Hacskeylo (1953) perfeccionó el método utilizando vermiculita, de mayor capacidad de aireación y retención de agua que la arena. Marx y Zak (1965) estabilizaron el pH del substrato mediante la adición de turba finamente dividida.

Trappe (1967) utilizó recipientes que mantenían la parte aérea de la planta en contacto con el aire exterior y la raíz en condiciones asépticas para no limitar la disponibilidad de CO₂ que se producía en los otros sistemas.

Piché y Fortin (1982) utilizaron bolsas de plástico conteniendo un papel secante y solución nutritiva en condiciones no asépticas. De este modo, el sistema radicular de la planta crece en un solo plano sobre la superficie del papel y es fácilmente observable. La formación de micorrizas tiene lugar en pocos días. Entre los inconvenientes se encuentra la condición no aséptica del conjunto, la cual no permite el control de los microorganismos que pueden variar entre experimentos, y la dificultad de controlar el grado de humedad y disponibilidad de nutrientes en el papel.

Yang y Wilcox (1984) desarrollaron un método consistente en unos tubos tapados con corcho y aireados con un tubo de vidrio que permitían a la parte aérea de la planta el crecimiento en el exterior. El interior de los tubos

se revestía de papel para cromatografía relleno de una mezcla de turba y vermiculita humedecida con solución nutritiva. La planta se disponía entre la pared del tubo y el papel, manteniendo la parte aérea en el exterior a través de un agujero en el corcho.

Otros autores han utilizado un medio nutritivo agarificado donde crecen juntos hongo y planta hospedadora en un contenedor de cristal (Mason 1980). Este método ha resultado efectivo para la formación de micorrizas en *Betula* sp. con especies de *Amanita*, *Laccaria* y *Leccinum*.

En Oregón se diseñó un sistema que ofrece excelentes resultados (Molina 1979a; Molina y Palmer 1982). Como recipientes se utilizan tubos de vidrio de 300 x 38 mm en los que se añade un substrato compuesto por vermiculita y turba, humedecido con medio líquido MMN (Marx 1969) y tapado con un vaso invertido de vidrio. El conjunto se autoclava a 120°C durante 15 minutos. Durante este proceso, el líquido queda incorporado totalmente al substrato permitiendo la existencia de numerosas cavidades que mantienen aireada la mezcla. Posteriormente, se introduce la semilla previamente desinfectada superficialmente y germinada. El hongo puede ser introducido al mismo tiempo que la semilla o antes en el caso de hongos de crecimiento muy lento. La inoculación consiste en la transferencia de discos de micelio obtenidos de colonias creciendo en medio agarificado o de cultivos líquidos. Las condiciones ambientales de los tubos pueden ser variadas, aunque ha de evitarse el calentamiento del sistema radicular por lo que ha dado buenos resultados la utilización de un tanque lleno de agua corriente continuamente renovada, donde se colocan los tubos para enfriar el substrato y las raíces, mientras que la parte aérea está expuesta una fuente de iluminación de 11.000 lux durante 15 horas al día (Molina y Palmer 1982).

Aunque el número de especies de hongos asociados a abeto de Douglas se supone muy elevado (Trappe 1977), se requiere una demostración experimental para determinar la capacidad simbiótica de un aislamiento. La Tabla 2.3.(a) recoge la bibliografía existente en la que se ha demostrado la

TABLA 2.3.(a)

Revisión bibliográfica de las especies de hongos ectomicorrícicos asociadas experimentalmente a abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco).

ESPECIE DE HONGO	TIPO DE EXPERIENCIA	REFERENCIA
<i>Amanita muscaria</i>	Inoculación con esporas	Chu-Chou y Grace 1981
<i>Astraeus pteridis</i>	Síntesis cultivo puro	Trappe 1967
<i>Boletus sp.</i>	Comparación cultivos	Chu-Chou y Grace 1983
<i>Cantharellus cibarius</i>	Asociación con micorriza	Froidevaux 1975
<i>Cenococcum geophilum</i>	Síntesis cultivo puro	Trappe 1962b
<i>Cortinarius croceifolius</i>	Asociación con micorriza	Zak 1969b
<i>C. sanguineus</i>	Asociación con micorriza	Zak 1969b
<i>C. semisanguineus</i>	Asociación con micorriza	Zak 1969b
<i>Endogone flammicorona</i>	Inoculación con esporas	Fassi y Palenzona 1969
<i>Fuscoboletinus aeruginascens</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Gastroboletus subalpinus</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Inoculación vivero	Le Tacon y Valdenaire 1980
<i>H. crustuliniforme</i>	Síntesis cultivo puro	Trappe 1967
<i>Inocybe corydalina</i>	Inoculación con esporas	Chu-Chou y Grace 1981
<i>I. geophylla</i>	Asociación con micorriza	Froidevaux 1975
<i>I. jurana</i>	Inoculación con esporas	Chu-Chou y Grace 1981
<i>I. maculata</i>	Inoculación con esporas	Chu-Chou y Grace 1981
<i>I. xanthomelas</i>	Asociación con micorriza	Zak 1969b
<i>Laccaria bicolor</i>	Inoculación vivero	Hung 1984
<i>L. laccata</i>	Inoculación vivero	Trappe y Strand 1969
<i>Lactarius deliciosus</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>L. sanguifluus</i>	Asociación con micorriza	Zak 1969b
<i>Leccinum manzanitae</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Melanogaster intermedius</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Paxillus involutus</i>	Síntesis cultivo puro	Laiho 1970
<i>Piloderma byssinum</i>	Asociación con micorriza	Froidevaux 1975
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Inoculación experimental	Marx 1977b
<i>Poria terrestris</i>	Asociación con micorriza	Zak 1969a
<i>Rhizopogon sp.</i>	Comparación cultivos	Chu-Chou y Grace 1983
<i>R. colossus</i>	Síntesis cultivo puro	Trappe 1967
<i>R. villosulus</i>	Asociación con micorriza	Acsai y Largent 1983
<i>R. vinicolor</i>	Identificación micelio	Zak 1971
<i>Russula ochroleuca</i>	Identificación micorriza	Jansen y De Nie 1988
<i>Scleroderma bovista</i>	Inoculación con esporas	Chu-Chou y Grace 1981
<i>S. citrinum</i>	Identificación micorriza	Jansen y De Nie 1988
<i>S. hypogaeum</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Suillus brevipes</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>S. cavipes</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>S. grevillei</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>S. lakey</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>S. subolivaceus</i>	Síntesis cultivo puro	Trappe 1967
<i>Thelephora terrestris</i>	Inoculación vivero	Trappe y Strand 1969
<i>Tricholoma flavovirens</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Truncocolumella citrina</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a
<i>Tuber sp.</i>	Inoculación con esporas	Chu-Chou y Grace 1981
<i>Zelleromyces gilkeyae</i>	Síntesis cultivo puro	Molina y Trappe 1982a

formación de ectomicorrizas de abeto de Douglas con distintas especies de hongos ectomicorrícicos, incluyendo el método utilizado que consiste en la síntesis en cultivo puro en la mayoría de los casos. En la citada tabla, únicamente se incluye la primera referencia cronológica para cada especie de hongo probada.

2.3.1 Material y métodos

Las semillas de abeto de Douglas que se utilizaron en los ensayos de síntesis de ectomicorrizas fueron importadas del estado de Oregon (origen 261, lote n° 313-1980). Las semillas se desinfectaron superficialmente con H₂O₂ (30%) siguiendo los siguientes pasos:

- 1. Lavado con agua corriente durante 12 horas.
- 2. Mantener en agitación con agua y Tween 20 durante 1 hora.
- 3. Lavado en agua corriente durante 1 hora.
- 4. Inmersión en H₂O₂ en agitador durante 1 hora.
- 5. Lavado con 2 litros de agua destilada estéril.

Durante los procesos de desinfección, las semillas se mantuvieron en un recipiente de plástico perforado en la base para sumergirlo en los sucesivos líquidos.

Posteriormente a la desinfección, las semillas se introdujeron para su germinación en viales de vidrio conteniendo agar malta (Difco) al 2%. Cuando las plántulas presentaban una radícula de unos 2 cm. de longitud, se transfirieron al interior de tubos de vidrio esterilizados que contenían una mezcla de 110 ml. de vermiculita y 20 ml. de turba humedecida con medio líquido MMN, según la técnica descrita por Molina y Palmer (1982) modificada con doble cantidad de turba para acidificar el sustrato hasta pH 5. La vermiculita (Asfaltex, grado 3) fue previamente tamizada con luz de 5 mm.

recogiendo la parte gruesa, mientras que la turba (Floratorf 300 no fertilizada) fue tamizada con luz de 1 mm. recogiendo la parte fina.

Los aislamientos probados en este ensayo provienen, en su mayor parte, de esporocarpos recolectados en distintas zonas del norte de España asociados a diversas especies arbóreas. Parte de los cultivos fueron obtenidos a partir de una colección procedente de Estados Unidos (Oregon State University Culture Collection) o a través de intercambios con el Reino Unido (University of Surrey) e Italia (Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale).

Un mes después de la siembra, se comprobó la ausencia de contaminantes en los tubos y se inocularon con un homogeneizado miceliar de las diferentes especies de hongos a probar. El inóculo se obtuvo mediante una trituradora con recipiente metálico esterilizable (Waring blender) conteniendo agua destilada a la que se añadieron colonias de 25 días de hongos ectomicorrícicos que se sembraron previamente en MMN agarificado. La homogeneización de las colonias se realizó por trituración a alta velocidad durante 20 s. y se dispensó el contenido a razón de 12 ml. de homogeneizado por tubo de síntesis. En total se prepararon 5 repeticiones para cada aislamiento probado y se mantuvieron durante un período medio de tres meses en un aparato de síntesis, en el que las temperaturas de exposición del sistema radicular no sobrepasaron los 25°C y la intensidad lumínica se mantuvo alrededor de 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ mediante tubos fluorescentes "cool white" de alta intensidad, con un fotoperíodo de 16 horas.

Al final del período de crecimiento, las plantas se extrajeron cuidadosamente del tubo de síntesis y se lavaron con agua corriente. El sistema radicular se examinó bajo el estereomicroscopio a 40X y se tomaron datos sobre el porcentaje de raíces cortas micorrizadas respecto al total de raíces cortas (infectadas y no infectadas). La confirmación de la infección se realizó mediante observación de la red de Hartig al microscopio. Una parte del sustrato se sembró en placas de MMN para detectar posibles contaminantes y reaislar el hongo originalmente introducido. Las micorrizas obtenidas a partir

de cada hongo probado fueron fotografiadas y posteriormente fijadas en FAA (formalina - ácido acético - etanol) para referencias futuras.

2.3.2 Resultados

En total se probaron 48 aislamientos correspondientes a 36 especies de hongos. Un total de 24 especies (32 aislamientos) formaron ectomicorrizas en las condiciones experimentales establecidas (Tabla 2.3.(b)). Un total de 15 especies (16 aislamientos) formaron un porcentaje de micorrizas superior al 50% de las raíces cortas. La mayoría de los aislamientos crecieron rápidamente y de manera homogénea en el sustrato (*Laccaria* spp., *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon* spp., *Scleroderma citrinum*, *Suillus* spp.) mientras que otros crecieron desarrollando densas agrupaciones de micelio irregularmente localizadas (*Amanita* spp., *Cenococcum geophilum*, *Melanogaster broomeianus*). El género *Lactarius* desarrolló un característico micelio muy ténue apenas visible a simple vista con hifas laticíferas más gruesas y de color blanco.

La abundancia y aparición de ectomicorrizas varió marcadamente de forma inter- e intraespecífica. De las cuatro especies de *Amanita* probadas, *A. aspera*, dos aislamientos de *A. muscaria* y *A. rubescens* formaron micorrizas, siendo esta última especie la que desarrolló un mayor porcentaje de infección. *A. citrina* no formó micorrizas

Cenococcum geophilum A-144 formó un bajo porcentaje de micorrizas y mantuvo un crecimiento muy lento en el tubo de síntesis.

Las dos especies de *Hebeloma* probadas mostraron una capacidad formadora de micorrizas muy elevada, a pesar del lento crecimiento de *H. sinapizans* (Figura 2.2.(a)). *Laccaria* spp. mostró un excelente crecimiento y capacidad de formar ectomicorrizas con abeto de Douglas. *L. bicolor* y *L. laccata* formaron un porcentaje de micorrización superior al 90 %.

TABLA 2.3.(b)

Resultados de los ensayos de síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro realizados con abeto de Douglas inoculado con cultivos líquidos de distintas especies de hongos.

ESPECIE	Nº CULT.	LOCALIDAD	ESPECIE ASOC.	% MIC.
			(*)	
<i>Amanita aspera</i>	A-48	Oviedo	Q.rob	33
<i>A. citrina</i>	A-145	Girona	A.gra	0
<i>A. muscaria</i>	A-17	Pontevedra	C.sat	40
<i>A. muscaria</i>	A-124	Girona	A.gra	18
<i>A. rubescens</i>	A-148	Girona	F.syl	93
<i>Boletus edulis</i>	A-39	Oviedo	P.syl	0
<i>B. erythropus</i>	A-45	Oviedo	F.syl	0
<i>B. pulverulentus</i>	A-146	Girona	P.men	0
<i>C. geophilum</i>	A-144	Girona	F.syl	20
<i>Cortinarius purpurascens</i>	A-14	Pontevedra	C.sat	0
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	S-20	U.K.	?	92
<i>H. sinapizans</i>	A-126	Barcelona	P.abi	80
<i>Laccaria bicolor</i>	S-238	U.S.A.	L.occ	94
<i>L. laccata</i>	A-127	Girona	Q.ile	100
<i>Lactarius deliciosus</i>	A-81	Oviedo	P.pin	0
<i>L. deliciosus</i>	A-120	Girona	P.pin	0
<i>L. deliciosus</i>	A-159	Barcelona	P.pin	16
<i>L. rufus</i>	A-34	Oviedo	P.syl	22
<i>Lyophyllum decastes</i>	A-71	Oviedo	P.rad	90
<i>Melanogaster ambiguus</i>	A-132	Girona	P.men	30
<i>Paxillus involutus</i>	A-87	Pontevedra	C.sat	67
<i>Pisolithus tinctorius</i>	A-93	Girona	Q.sub	94
<i>Rhizopogon colossus</i>	S-148	U.S.A.	P.men	25
<i>R. ellенаe</i>	8974	U.S.A.	P.pon	0
<i>R. hawkeri</i>	S-274	U.S.A.	P.men	64
<i>R. hawkeri</i>	7433	U.S.A.	?	53
<i>R. luteolus</i>	A-5	Pontevedra	P.pin	0
<i>R. luteolus</i>	A-106	Pontevedra	P.pin	0

(...) Continúa

TABLA 2.3.(b)

Continuación.

ESPECIE	Nº CULT.	LOCALIDAD	ESPECIE ASOC.	% MIC.
			(*)	
<i>R. mutabilis</i>	S-483	U.S.A.	?	42
<i>R. occidentalis</i>	7544	U.S.A.	P.pon	0
<i>R. roseolus</i>	A-7	Oviedo	P.rad	30
<i>R. roseolus</i>	A-96	Tarragona	P.syl	25
<i>R. roseolus</i>	M-1	Murcia	P.hal	58
<i>R. roseolus</i>	M-2	Albacete	P.pin	14
<i>R. subareolatus</i>	A-116	Girona	P.men	95
<i>R. subcaerulescens</i>	E-138	U.S.A.	A.gra	0
<i>R. ventricisporus</i>	A-97	Tarragona	P.syl	0
<i>R. vulgaris</i>	A-56	Oviedo	P.rad	54
<i>R. vulgaris</i>	A-98	Pontevedra	P.pin	23
<i>R. vulgaris</i>	A-101	Pontevedra	P.pin	12
<i>Scleroderma citrinum</i>	A-37	Oviedo	C.sat	76
<i>Suillus bovinus</i>	A-75	Pontevedra	C.sat	70
<i>S. bovinus</i>	A-21	Oviedo	P.rad	17
<i>S. collinitus</i>	I-1	ITALIA	P.nig	73
<i>S. luteus</i>	A-33	Oviedo	P.rad	10
<i>Tricholoma saponaceum</i>	A-121	Gerona	P.men	0
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	A-119	Gerona	P.men	0
<i>X. chrysenteron</i>	A-147	Gerona	P.men	0

(*)

A.gra: *Abies grandis*
C.sat: *Castanea sativa*
F.syl: *Fagus sylvatica*
L.occ: *Larix occidentalis*
P.abi: *Picea abies*
P.hal: *Pinus halepensis*
P.men: *Pseudotsuga menziesii*
P.nig: *Pinus nigra*
P.pin: *Pinus pinaster*
P.pon: *Pinus ponderosa*
P.rad: *Pinus radiata*
P.syl: *Pinus sylvestris*
Q.ile: *Quercus ilex*
Q.rob: *Quercus robur*
Q.sub: *Quercus suber*

Lactarius deliciosus A-159 y *Lactarius rufus*, considerados como asociados al género *Pinus*, formaron un porcentaje bajo de ectomicorrizas con abeto de Douglas en las condiciones ensayadas. Se probaron también otros dos aislamientos de *L. deliciosus* con resultados negativos.

Lyophyllum decastes formó un elevado porcentaje de micorrizas y mostró un buen crecimiento, al igual que *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma citrinum*.

De los 19 aislamientos de *Rhizopogon* probados en un total de 11 especies, todos los pertenecientes a la sección *Villosuli* (*R. colossus*, *R. hawkeri*, *R. mutabilis* y *R. subareolatus*) formaron micorrizas, siendo *R. subareolatus* la especie que formó un porcentaje más alto. Las especies pertenecientes a la sección *Amylopogon* (*R. ellenae* y *R. subcaerulescens*) no formaron micorrizas, mientras que de las especies pertenecientes a la sección *Rhizopogon* (*R. luteolus*, *R. occidentalis*, *R. roseolus*, *R. ventricisporus* y *R. vulgaris*), únicamente *R. roseolus* y *R. vulgaris* formaron ectomicorrizas.

Las tres especies de *Suillus* probadas formaron micorrizas. *S. collinitus* y el aislamiento A-75 de *S. bovinus* formaron un porcentaje de micorrizas superior al 50%.

No se observó formación de ectomicorrizas en *Boletus* spp., *Cortinarius purpurascens*, *Tricholoma saponaceum* ni *Xerocomus chrysenteron*.

A continuación se describen macroscópicamente las micorrizas formadas en abeto de Douglas mediante síntesis en cultivo puro. Inicialmente se indica el período de tiempo transcurrido desde la inoculación con el cultivo líquido del hongo hasta la lectura del experimento. Los números de cultivo corresponden a los aislamientos probados. En el caso de que se hayan probado varios aislamientos, la descripción corresponde al primero. Los hongos subrayados indican que su capacidad de formar micorrizas con abeto de Douglas no había sido descrita anteriormente.

Amanita aspera (Fr.)Hooker. A-48

Período de crecimiento: 100 días

Elementos simples de color blanco brillante y aspecto algodonoso con micelio compacto en la superficie formando un entramado de hifas visible al estereomicroscopio. Recubrimiento miceliar abundante en raíces laterales. Rizomorfas muy escasas y finas de color blanco. Crecimiento local y lento del micelio en el tubo de síntesis.

Amanita muscaria (L. ex Fr.)Hooker. A-17 (A-124)

Período de crecimiento: 120 días

Elementos simples y de aspecto engrosado, con superficie blanca-beige brillante y lisa con escaso micelio emergente. Cordones miceliar abundantes en la base de las micorrizas recubriendo parcialmente las raíces laterales. Recubrimiento miceliar parcial en raíces laterales. Crecimiento escaso del micelio en el tubo de síntesis, formando zonas blancas locales con micelio denso y bien visibles.

Amanita rubescens (Pers. ex Fr.)Gray. A-148

Período de crecimiento: 124 días

Elementos simples o ramificados, de color blanco-beige brillante y superficie lisa aterciopelada. Presencia de rizomorfas blancas, de aspecto delicado y escasas aunque bien visibles en la base de las micorrizas y dispersas por el substrato del tubo de síntesis. Micelio ténue y poco visible en el substrato.

Cenococcum geophilum Fr. A-144

Período de crecimiento: 125 días

Elementos simples, de color negro brillante y recubiertos de filamentos hirsutos y gruesos. Presencia de micelio negro recubriendo localmente algunas zonas de las raíces laterales. No se aprecian rizomorfas. Presencia de escasos esclerocios negros y recubiertos de hifas negras hirsutas

alrededor de algunas micorrizas. Micelio negro localmente visible en el tubo de síntesis.

***Hebeloma cylindrosporum* Romagn. S-20**

Período de crecimiento: 100 días

Elementos simples de color blanco sucio a beige brillante y aspecto algodonoso con la capa de micelio externa fácilmente desprendible. Abundante micelio externo laxo y algodonoso alrededor de las micorrizas. Presencia de micelio blanco recubriendo las raíces laterales y parte de la principal. No se detectaron rizomorfos. Abundancia de micelio en el tubo de síntesis apelmazando el substrato alrededor de las raíces.

***Hebeloma sinapizans* (Paulet ex Fr.) Gill. A-126**

Período de crecimiento: 90 días

Elementos simples, de color blanco brillante y con abundante micelio externo blanco recubriendo la micorriza completamente. Recubrimiento de micelio en raíces laterales. No se aprecian rizomorfos. Presencia de abundante micelio en el tubo de síntesis aunque poco aparente.

***Laccaria bicolor* (R. Mre.) Orton. S-238**

Período de crecimiento: 60 días

Elementos simples o ramificados. Superficie lisa ligeramente aterciopelada de color blanco a anaranjado o marrón claro con reflejos violáceos en las puntas en algunos casos (generalmente en micorrizas jóvenes). Micelio externo muy tenue y poco visible. No se aprecian rizomorfos. Micelio abundante en el tubo de síntesis aunque poco aparente.

***Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.) Bk. e Br. A-127**

Período de crecimiento: 93 días

Elementos simples o ramificados, lisos, de color rosado a anaranjado en

ocasiones con reflejos violáceos. Micelio externo ténue hialino. Sin rizomorfias. Abundante crecimiento del micelio en el tubo aunque poco aparente por el aspecto laxo e hialino.

***Lactarius deliciosus* Fr. A-159**

Período de crecimiento: 134 días

Elementos simples, lisos, de color verde oscuro y sin micelio externo visible. No se aprecian rizomorfias. Sin recubrimiento miceliar de raíces laterales. Presencia de micelio muy ténue y laxo en el tubo de síntesis juntamente con abundantes hifas gruesas de color blanco conteniendo látex.

***Lactarius rufus* (Scop.)Fr. A-34**

Período de crecimiento: 84 días

Elementos simples, lisos y de color marrón rojizo. No se aprecia recubrimiento de micelio alrededor de las raíces laterales ni rizomorfias. Micelio muy tenue y apenas visible en el interior del tubo de síntesis.

***Lyophyllum decastes* (Fr.)Sing. A-71**

Período de crecimiento: 108 días

Elementos simples o pinnados de color blanco sucio. Aspecto granuloso con abundante micelio externo. Raíces laterales recubiertas de micelio. No se aprecian rizomorfias. Crecimiento del hongo abundante, rápido y visible en el tubo de síntesis.

***Melanogaster ambiguus* (Vitt.)Tul. A-132**

Período de crecimiento: 93 días

Elementos simples, con aspecto aterciopelado, de color marrón dorado. Rizomorfias muy abundantes y largas, de igual color que el manto, recubriendo toda la raíz. Crecimiento del hongo en el tubo muy lento aunque aparente por la densidad del micelio.

***Paxillus involutus* (Batsch)Fr. A-87**

Período de crecimiento: 90 días

Elementos simples, aterciopelados y de color blanco sucio. Abundante micelio externo de color marrón claro. No se apreciaron rizomorfias. Crecimiento denso del micelio en el interior del tubo.

***Pisolithus tinctorius* (Pers.)Coker & Couch. A-93**

Período de crecimiento: 107 días

Elementos simples o ramificados, en ocasiones alargados y con formas retorcidas. Aspecto brillante liso o aterciopelado si se observa con aumento por la laxa disposición de la trama de hifas del manto. Color amarillo intenso. Rizomorfias abundantes de color amarillo, gruesas y ramificadas. Crecimiento denso y abundante del micelio en el interior del tubo. En ocasiones, se forman esclerocios redondeados con rizomorfias.

***Rhizopogon colossus* Smith. S-148**

Período de crecimiento: 120 días

Elementos simples, con superficie algodonosa blanco-beige de aspecto deshilachado. No se observan rizomorfias. Presencia de hifas marrones de pared gruesa intercaladas en el manto. Micelio abundante visible en el tubo de síntesis.

***Rhizopogon hawkeri* Smith. S-274 (7433)**

Período de crecimiento: 74 días

Elementos simples, alargados, de aspecto algodonoso y de color blanco con manto fácilmente desprendible. Al microscopio se observan hifas gruesas de color marrón oscuro intercaladas en el manto. Rizomorfias de escasas a abundantes, marrones y ramificadas. Crecimiento escaso de hongo en el tubo.

Rhizopogon mutabilis Smith. S-483

Período de crecimiento: 90 días

Elementos simples, algodonosos y de color blanco. Micelio externo blanco y abundante recubriendo las raíces laterales. Se aprecian hifas gruesas marrones características en el manto. Rizomorfos no detectados. Buen crecimiento del hongo en el tubo de síntesis.

Rhizopogon roseolus (Corda) Hollos. A-96 (M-1, M-2, A-7)

Período de crecimiento: 90 días

Elementos simples, en ocasiones muy largos por transformación de una lateral en crecimiento. Aspecto algodonoso o granuloso de color blanco y con abundante micelio externo fino y denso con escaso recubrimiento radicular. Formación aparentemente en estado inicial. No se aprecian rizomorfos. Abundante crecimiento micelial en el tubo.

Rhizopogon subareolatus Smith. A-116

Período de crecimiento: 82 días

Elementos simples o pinnados de aspecto algodonoso y color blanco intenso, con abundante micelio externo blanco que llega a recubrir las raíces laterales y principal. Presencia abundante de hifas gruesas marrones intercaladas en el manto y bien visibles al microscopio. Este mismo tipo de hifas puede observarse en el interior del peridio de los esporocarpos. Rizomorfos abundantes, marrones y ramificados. Colonización del tubo de síntesis muy visible y rápida.

Rhizopogon vulgaris (Vitt.) M. Lange. A-56 (A-98)

Período de crecimiento: 90 días

Elementos simples, de superficie algodonosa con abundante micelio externo blanco. Recubrimiento micelial abundante en raíces laterales y principal. Rizomorfos abundantes de color blanco y ramificados. Micelio abundante y

visible en el tubo.

***Scleroderma citrinum* Pers. A-37**

Período de crecimiento: 119 días

Elementos simples, de color blanco brillante y superficie lisa recubierta de abundante micelio externo blanco. Recubrimiento miceliar a lo largo de laterales y raíz principal. Cordones miceliares abundantes de color blanco. Crecimiento del micelio muy visible en el tubo de síntesis.

***Suillus bovinus* (L. ex Fr.)O. Kuntze. A-75 (A-21)**

Período de crecimiento: 140 días

Elementos simples, de color blanco brillante y recubiertas de abundante micelio externo de aspecto compacto. Abundante recubrimiento miceliar de la raíz principal y laterales. Rizomorfias abundantes, de color blanco y ramificadas. Presencia de abundante micelio blanco muy visible en el tubo de síntesis.

***Suillus collinitus* (Fr.)O. Kuntze. I-1**

Período de crecimiento: 80 días

Elementos simples de color anaranjado claro y de aspecto liso con micelio externo blanco escaso. No se aprecian rizomorfias. Abundante y denso micelio blanco visible en el tubo de síntesis.

***Suillus luteus* (L. ex Fr.)S.F. Gray. A-33**

Período de crecimiento: 136 días

Elementos simples, lisos y de color miel, con micelio externo ténue y escaso. Aspecto inmaduro. Recubrimiento de micelio escaso en raíces laterales. No se aprecian rizomorfias.

2.3.3. Discusión

Los ensayos de síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro han permitido realizar una selección de los aislamientos que pueden formar ectomicorrizas con abeto de Douglas. Se ha demostrado la formación de ectomicorrizas de un total de 14 especies (20 aislamientos) que no habían sido descritas anteriormente. De estas especies, se había observado previamente la asociación en campo con abeto de Douglas en *Amanita aspera*, *Lactarius rufus*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus luteus* (Trappe 1962a), aunque la formación de ectomicorrizas no había sido demostrada experimentalmente (Tabla 2.3.(a)). Un total de 8 de las 14 nuevas asociaciones demostradas formaron un porcentaje de micorrizas superior al 50 %.

Los aislamientos probados incluyeron 14 especies de plantas hospedadoras distintas. Muchos hongos asociados a especies arbóreas frecuentes en Europa formaron ectomicorrizas con abeto de Douglas, demostrando que esta especie puede ser infectada por hongos ectomicorrícicos ya existentes en el suelo. Este aspecto es de gran importancia para su utilización en reforestación en Europa (Le Tacon et al. 1984).

Entre las especies recolectadas con abeto de Douglas y probadas en síntesis, únicamente los hongos hipogeos formaron micorrizas en las condiciones ensayadas. En este grupo de hongos, cabe destacar la consistencia entre las asociaciones micorrícicas de *Rhizopogon* spp. pertenecientes a la sección Villosuli (Smith y Zeller 1966) con abeto de Douglas. *R. roseolus* y *R. vulgaris* pertenecientes a la sección Rhizopogon son especies consideradas como ectomicorrícicas de *Pinus* sp. (Molina y Trappe 1982a), aunque mostraron una cierta afinidad con abeto de Douglas con una marcada variabilidad infraespecífica.

La variabilidad entre cepas de una misma especie en el porcentaje de

micorrizas formado, ha sido observada en la práctica totalidad de las especies probadas. En *Lactarius deliciosus* se han encontrado cepas formadoras y no formadoras de ectomicorrizas con abeto de Douglas. Sin embargo, en la mayoría de especies se ha observado una gradación en el porcentaje de micorrizas formado por los distintos aislamientos. La variación ecotípica entre cepas de la misma especie puede ser tan marcada como las diferencias entre especies (Trappe 1977) por lo que la selección debe realizarse a nivel de cepa.

3. TECNICAS DE INOCULACION DE ABETO DE DOUGLAS EN CONTENEDOR

El manejo integrado de las micorrizas y los microorganismos del suelo puede constituir un factor importante en programas de reforestación (Perry et al. 1987). Sus tres principales componentes son:

1. Protección de la comunidad microbiana indígena del suelo (incluyendo a los hongos ectomicorrícicos) y evaluación de las necesidades de inoculación. Este componente incluye el estudio de los factores que influyen en la formación de micorrizas por hongos indígenas en las zonas alteradas, como el balance entre la mortalidad y aporte de propágulos, establecimiento de plantas huésped y diversidad de especies fúngicas. Igualmente se debe realizar un seguimiento de la formación de micorrizas y su relación con el crecimiento y supervivencia de la planta.

2. Integración de las técnicas de inoculación en el manejo de viveros. La presencia natural de ectomicorrizas en viveros forestales tecnificados puede ser errática y principalmente constituida por hongos adaptados a las condiciones de vivero, pero posiblemente poco eficaces en las condiciones de las zonas de trasplante. Los programas de inoculación se deben dirigir hacia un objetivo concreto, ya sea incrementar el crecimiento o la uniformidad de la planta en vivero, la resistencia a enfermedades, su supervivencia en condiciones adversas, o incrementar su crecimiento en plantaciones rutinarias. Cada objetivo requiere la utilización de estrategias distintas. Los programas de inoculación con hongos seleccionados y adaptados a las zonas de reforestación constituyen una de las formas de aplicación de la tecnología de las micorrizas en viveros y el objetivo de estudio en este capítulo.

3. **Necesidades de investigación** para una mejor comprensión de las interacciones entre los hongos ectomicorrícicos, las plantas huéspedes y el ambiente. La investigación futura debe incluir la micorrizosfera y el ecosistema en conjunto, considerando el estudio de las adaptaciones de los hongos ectomicorrícicos a factores ambientales particulares, las interacciones entre plantas y los procesos que ocurren en la zona de influencia de las raíces (rizosfera) y las micorrizas (micorrizosfera), y el papel de las micorrizas y otros microorganismos en la estructura y procesos del ecosistema, particularmente en los ciclos de nutrientes, estructura del suelo e interacciones entre plantas.

Los objetivos de este capítulo se encuadran dentro de la aplicación de la tecnología de las micorrizas en la producción de plantas destinadas a reforestación y son: la puesta a punto de técnicas de inoculación de abeto de Douglas producido en contenedor con hongos ectomicorrícicos seleccionados, la evaluación del porcentaje de colonización radicular y la determinación de la dosis óptima de aplicación.

La primera parte del capítulo se dedica a la revisión de las condiciones de crecimiento óptimas para el desarrollo de las plantas de abeto de Douglas producidas en contenedor y para el establecimiento de los hongos simbiotes introducidos.

Los ensayos de inoculación se realizaron con tres tipos de inóculo:

- **Inóculo vegetativo o miceliar.** Este tipo de inóculo permite la utilización de hongos previamente seleccionados en función de su capacidad de formación de ectomicorrizas en cultivo puro con abeto de Douglas y su facilidad de mantenimiento en cultivo. La formación de ectomicorrizas en cultivo puro proporciona una información básica para determinar la capacidad simbiótica de un aislamiento con una determinada especie arbórea en condiciones óptimas. Sin embargo, la formación de ectomicorrizas en condiciones de vivero dependerá de múltiples factores entre los que se encuentran la capacidad del hongo

para sobrevivir a la manipulación que conlleva la producción de inóculo y su aplicación, así como las prácticas viveristas que se realizarán a lo largo del ciclo de producción de las plantas.

- **Inóculo miceliar incluido en gel de alginato.** Esta técnica permite proteger al inóculo mediante la inclusión de micelio en un gel de alginato polimerizado. La protección permite una mejor conservación del hongo y facilita su dosificación.

- **Inóculo en forma de esporas.** La recolección sistemática de esporocarpos de determinados hongos ha permitido la selección de aquellas especies recolectadas con regularidad en distintos bosques y plantaciones. La recolección se ha centrado básicamente en hongos hipogeos que producen un gran número de esporas y se encuentran frecuentemente asociados al abeto de Douglas. Sin embargo, se han utilizado también como fuente de inóculo algunos Gasteromicetos epigeos. Algunos de estos hongos no han podido ser aislados en cultivo puro, pero la confirmación de su capacidad micorrícica fue realizada a partir de la inoculación con sus esporas de la planta huésped apropiada.

La utilización óptima del inóculo requiere la realización de estudios de dosis para determinar la cantidad mínima de inóculo requerida para maximizar el porcentaje de micorrización. Los estudios de dosis se han realizado con los tres tipos de inóculo para establecer dosis óptimas de aplicación.

3.1 PRODUCCION DE ABETO DE DOUGLAS EN CONTENEDOR

Tipo de contenedor

Los ensayos de inoculación se han realizado en contenedores root-trainers Spencer-Lemaire (Spencer 1974) fabricados en Canadá, modelo Sherwood de 175 cc de capacidad. Este tipo de contenedores consisten en dos mitades de plástico rígido negro con cuatro celdas que se cierran a modo de libro delimitando cuatro compartimentos. Las paredes están recorridas por surcos que guían a las raíces hacia la parte inferior, cuya exposición al aire permite la autopoda del sistema radicular. Este sistema previene la espiralización radicular (Hiatt y Tinus 1974).

Substrato

El substrato de crecimiento se ha elaborado a partir de una mezcla de turba y vermiculita. Este tipo de substrato tiene ventajas económicas y funcionales (Phipps 1974). Entre sus principales características se encuentran:

- ligereza de peso, lo que permite facilidad de operación.
- uniformidad en la composición, precio relativamente bajo y fácilmente disponible.
- relativamente libre de plagas y enfermedades.
- elevada capacidad de intercambio catiónico.
- elevada capacidad de almacenamiento de agua, con lo cual se requiere menor frecuencia de irrigación.
- pH ácido.
- buena aireación y drenaje, lo que favorece el desarrollo de las raíces cortas (Ruark et al. 1982) .

La turba utilizada procede del musgo *Sphagnum* sp. y no tiene ningún fertilizante añadido. Este tipo de turba tiene una gran capacidad de retención de agua y es la más adecuada para su utilización como sustrato de contenedores (Armson y Sadrieka 1974; Brix y van den Driessche 1974; Hellum 1975).

La vermiculita es un material micáceo que se expande a altas temperaturas (1100°C), formando unas partículas que encierran pequeñas cavidades de aire. Químicamente es un silicato de magnesio, aluminio y hierro hidratado. Cuando está expandida es muy ligera (100-140 kg. / m³) de reacción neutra y con buena capacidad tampón. Tiene además una elevada capacidad de intercambio catiónico con lo que puede almacenar nutrientes y liberarlos lentamente.

La mezcla de turba y vermiculita se ha realizado en la proporción 1:1 (v:v) con la que se han obtenido buenos resultados en el desarrollo de la mayoría de especies de coníferas (Barnett 1974; Tinus 1974). El pH final de la mezcla es de 5.5, favorable para el crecimiento de la mayoría de hongos ectomicorrícicos (Hung y Trappe 1983).

Irrigación

El riego se ha realizado de forma manual en función de las necesidades de la época de crecimiento. El exceso o defecto de agua puede reducir la formación de raíces finas del abeto de Douglas (Ruark et al. 1982). La sobreirrigación produce la formación de raíces de agua, de aspecto carnoso y engrosado con ausencia de pelos radiculares. La producción de este tipo de raíces no es deseable, ya que se descomponen rápidamente después del trasplante e impiden la formación de raíces cortas susceptibles de ser transformadas en ectomicorrizas (Dixon et al. 1983).

La composición del agua de riego se ha analizado para determinar la formulación de la solución nutritiva. El resultado del análisis se representa en

la Tabla 3.1.(a).

TABLA 3.1.(a)

Análisis del agua de riego utilizada en los ensayos de inoculación de plantas producidas en contenedor.

DETERMINACION	RESULTADO	METODO ANALITICO
pH	7.80	POTENCIOMETRICO
Cond. Elect. a 25°C	1.101 mS/cm	CONDUCTIMETRICO
Nitratos (NO ₃ ⁻)	1.2 meq./l.	ELECTROQUIMICO
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	2.33 meq./l.	COLORIMETRICO
Cloruros (Cl ⁻)	2.44 meq./l.	VAL. AMPEROMETRICA
Bicarbonatos (HCO ₃ ⁻)	6.0 meq./l.	VOLUMETRICO
Carbonatos (CO ₃ ⁻)	0.0 meq./l.	VOLUMETRICO
Potasio (K ⁺)	0.05 meq./l.	FOTOMETRIA DE LLAMA
Calcio (Ca ²⁺)	8.71 meq./l.	ABSORCION ATOMICA
Magnesio (Mg ²⁺)	2.01 meq./l.	ABSORCION ATOMICA
Sodio (Na ⁺)	1.97 meq./l.	FOTOMETRIA DE LLAMA

Fertilización

Los hongos ectomicorrícicos están adaptados a condiciones de baja fertilización típicas de suelos forestales. Los niveles elevados de fertilización en viveros pueden inhibir la formación de ectomicorrizas en algunas especies de hongos. Se ha comprobado en *Pisolithus tinctorius* que la formación de ectomicorrizas se reduce a niveles elevados de fertilizante NPK soluble

(Marx et al. 1977b; Crowley et al. 1986; Danielson et al. 1984; Dixon et al. 1985; Ekwebelam y Reid 1983; Maronek et al. 1981; Maronek et al. 1982; Marx et al. 1982; Pope y Chaney 1984; Ruehle 1980b; Ruehle y Wells 1984; Rupp y Mudge 1985). Otros hongos como *Laccaria laccata* y *Rhizopogon vinicolor* son poco sensibles a niveles elevados de fertilizante soluble y han sido introducidos con éxito en viveros comerciales sin necesidad de alterar el régimen normal de fertilización (Castellano et al. 1985; Danielson et al. 1984; Hung y Molina 1986b; Molina y Chamard 1983; Tyminska et al. 1986).

El tipo de fertilizante también puede influir en el desarrollo de las micorrizas. Los fertilizantes de liberación lenta pueden reducir la micorrización producida por *Rhizopogon vinicolor*, mientras que los fertilizantes solubles no han mostrado ningún efecto inhibitor en esta especie (Castellano et al. 1985).

En general es preferible el nitrógeno en forma de amonio que en forma de nitrato (Bledsoe y Zasoski 1983; Littke et al. 1984; Harley y Smith 1983). El nitrato incrementa el pH del medio, mientras que el amonio lo disminuye. La mayoría de los hongos ectomicorrícicos requieren condiciones ácidas, por lo que la fertilización con nitrato afectará negativamente a los hongos sensibles a valores elevados de pH.

La fertilización de las plantas se ha realizado con un fertilizante soluble NPK (Kristalon 17-6-18, Shell). Este fertilizante se ha combinado con otros dos preparados solubles a base de quelatos: Fetrilon 13 (BASF) y Hortrilon (BASF) para proporcionar hierro y micronutrientes respectivamente. Las composiciones de estos fertilizantes se representan en la Tabla 3.1.(b).

La aplicación de los fertilizantes se ha realizado cada tres semanas a partir de un mes después de la siembra, combinando 2.15 g. de Kristalon, 0.24 g. de Hortrilon y 0.18 g. de Fetrilon por litro de fertilizante preparado con agua corriente. De esta solución se dispensaron 10 ml. por planta. El aporte de nutrientes por planta en cada fertilización se representa en la Tabla 3.1.(c).

TABLA 3.1.(b)

Composición de los fertilizantes solubles utilizados en la producción de plantas de abeto de Douglas en contenedor.

ELEMENTO	KRISTALON (NPK)	HORTRILON	FETRILON
N	5.1 % (NO ₃ ⁻)		
	11.9 % (NH ₄ ⁺)		
P	6.0 % (P ₂ O ₅)		
K	18.0 % (K ₂ O)		
Fe		5.0 %	13.0 %
Mg		3.0 %	
Mn		2.5 %	
Zn		0.5 %	
Cu	0.01 %	2.5 %	
B	0.025 %	0.5 %	
Mo	0.001 %	0.5 %	

TABLA 3.1.(c)

Aporte de nutrientes por planta en cada fertilización (en mg.).

ELEMENTO	KRISTALON (NPK)	HORTRILON	FETRILON	TOTAL
N	3.65			3.65
P	1.29			1.29
K	3.87			3.87
Fe		0.12	0.23	0.35
Mg		0.07		0.07
Mn		0.06		0.06
Zn		0.01		0.01
Cu	0.002	0.06		0.062
B	0.005	0.01		0.015
Mo	0.0002	0.01		0.0102

Este grado de fertilización es relativamente bajo (aproximadamente la mitad de la dosis estándar de viveros en contenedor recomendada por Owston (1974)). Esta dosificación ha sido utilizada por Castellano et al. (1985) para abeto de Douglas producido en contenedor e inoculado con *Rhizopogon* spp., con resultados positivos en la formación de ectomicorrizas.

Condiciones ambientales

Las plantas se mantuvieron en un módulo de invernadero con paredes de cristal, sombreado con malla blanca (40 %) y con control de temperatura y humedad. La temperatura se estableció en un rango de 25°C como máximo y 20°C como mínimo, que resulta adecuado para el desarrollo de plantas de abeto de Douglas (Heninger y White 1974). La humedad relativa se mantuvo siempre por encima del 40 %.

La intensidad lumínica de saturación para el abeto de Douglas se sitúa alrededor de 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (Krueger y Ruth 1969). La intensidad de luz solar en el invernadero medida un día claro de Julio a las 12:00 (hora solar) es de unos 772 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ en el rango 400 - 700 nm. .

La utilización de sistemas de luces suplementarias se adoptó para alargar el período vegetativo durante los meses de otoño e invierno, evitando la entrada de la planta en dormición.

La inducción de la dormición puede evitarse por tres sistemas (Tinus y McDonald 1979):

- extensión del fotoperíodo
- interrupción del período de oscuridad (2-5 horas)
- realización de breves interrupciones de luz cada 5-30 min. a lo largo del período de oscuridad.

En la producción experimental de plantas en épocas de fotoperíodo

inferior a 16 horas, se utilizaron lámparas de sodio de alta presión. La disposición espacial de las lámparas se realizó de manera que la intensidad de luz mínima en cualquier punto de la banqueta del invernadero no fuera inferior a $200 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ en el rango 400-700 nm. Este tipo de lámparas tiene un máximo a 590 nm., con niveles aceptables de infrarrojo y nulos de ultravioleta.

Formación de raíces cortas

El sistema radicular de las plantas consiste en raíces morfológica y funcionalmente distintas. En la mayoría de árboles esta constituido por una raíz principal de tendencia geotrópica y sus ramificaciones laterales con tendencia al plagiotropismo o sin tendencia geotrópica (Wilson 1970).

Wilcox (1964) clasificó las raíces en raíces largas o laterales y raíces cortas o finas. Las raíces largas tienen el ápice puntiagudo y su vida es relativamente larga, llegando incluso a formar parte de la masa radicular permanente. Slankis (1958) propuso que las auxinas excretadas por los hongos micorrícicos eran trasladadas a las raíces largas, determinando la secuencia y la frecuencia de las raíces largas y cortas producidas. Las raíces cortas tienen los ápices redondeados en la mayoría de las especies, se elongan lentamente y suelen ser de vida corta. Este tipo de raíces constituye la zona de establecimiento principal de los hongos ectomicorrícicos (Wilcox 1967), aunque su presencia puede extenderse a las raíces largas (Wilcox 1968).

La expectativa de vida de las raíces cortas oscila entre pocos días en raíces no micorrizadas y varios años en raíces micorrizadas (Hermann 1977). Este factor se considera importante en el aumento de la efectividad en la captación de agua y nutrientes en plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas, ya que las raíces cortas permanecen activas durante un período de tiempo más largo (Bowen y Theodorou 1967).

El crecimiento radicular de las plantas esta regulado inicialmente por un control genético y, posteriormente, por un complejo conjunto de factores entre los que se encuentran parámetros ambientales, estado nutricional de la raíz y parte aérea, y reguladores del crecimiento (Hermann 1977). Por consiguiente, la extensión del sistema radicular puede variar considerablemente para la misma especie en condiciones diferentes.

El desarrollo del sistema radicular del abeto de Douglas en las condiciones de crecimiento descritas ha sido estudiado para determinar el modelo de producción de raíces cortas desde el momento de la germinación. Este factor es de gran importancia para predecir el tiempo que transcurre entre la inoculación del hongo en el momento de la siembra y la formación de raíces cortas susceptibles de ser micorrizadas. Los datos obtenidos han sido utilizados para coordinar el momento de la inoculación con esporas con la producción de raíces cortas y para interpretar los resultados de las inoculaciones miceliarias. La producción de raíces cortas desde la germinación se ha modelizado gráficamente en función de los grados de temperatura acumulados sumando las temperaturas medias de cada día desde el inicio del experimento (Figura 3.1.(a)).

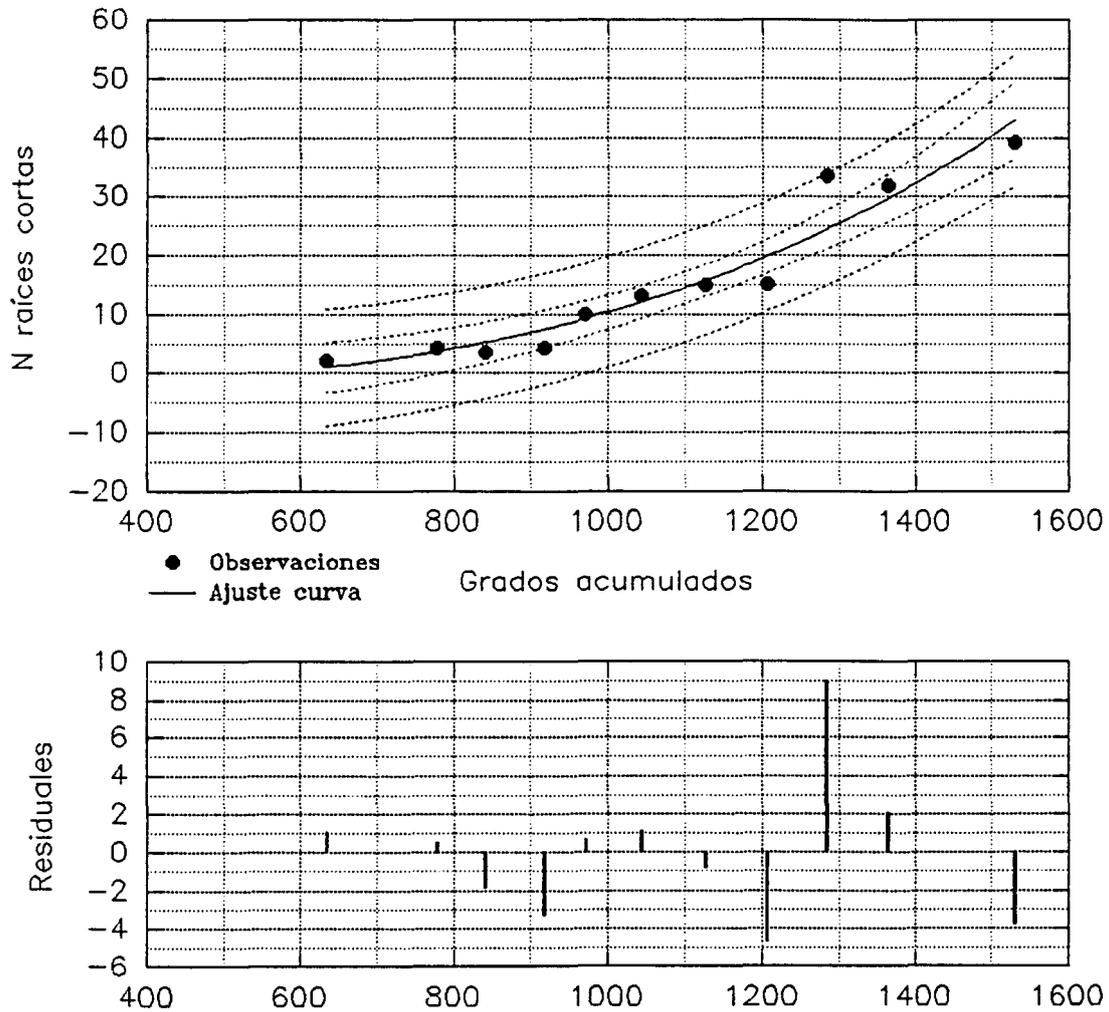
Los datos obtenidos indican que la formación de raíces cortas no se produce hasta un mes después de la siembra. Este período es considerablemente largo en comparación con los valores obtenidos para *Pinus pinaster* en ensayos paralelos en condiciones idénticas (R. Perrin, comunicación personal).

FIGURA 3.1.(a)

Modelo de formación de raíces cortas en *Pseudotsuga menziesii* en función de los grados de temperatura acumulados sumando la temperatura media diaria desde el momento de la germinación. Cada valor representa la media de cinco repeticiones. Se representan los intervalos de confianza para las medias (líneas más próximas a la curva de regresión) y para los valores de predicción (líneas más alejadas de la curva) para un límite de confianza del 99%. Los valores residuales frente a los valores de x se representan en el gráfico inferior como medida del ajuste de los datos.

Ecuación de la curva ajustada : $y = a + bx^3$ $a = -2.26$ $b = 1.26$

$r^2 = 0.92^{***}$ $F = 105.7$



3.2 INOCULACIONES MONOESPECIFICAS

En este apartado se incluyen los ensayos sobre inoculaciones de abeto de Douglas en contenedor con aislamientos de hongos ectomicorrícicos seleccionados y con esporas. En todos los métodos probados, se utilizará una única especie de hongo ectomicorrícico aplicada a distintas dosis. La determinación de la dosis mínima de inóculo para obtener el máximo porcentaje de raíces cortas infectadas, constituye una información básica para mantener al mínimo los costes de la inoculación.

3.2.1 INOCULO MICELIAR

El inóculo miceliar ha sido especialmente recomendado por varios autores por su eficacia para especies de hongos que crecen bien en cultivo puro (Shemakhanova 1962; Bowen 1965; Mikola 1973; Marx 1977a; Trappe 1977; Marx 1980). Este método permite la selección previa de los aislamientos por distintos parámetros fisiológicos y operativos, aunque el crecimiento lento de los hongos ectomicorrícicos en cultivo puro hace difícil la obtención de micelio suficiente para llevar a cabo la inoculación de un vivero comercial a gran escala (Trappe 1977; Marx y Kenney 1982).

Los métodos de inoculación con micelio de hongos ectomicorrícicos, han sido probados experimentalmente con los aislamientos seleccionados previamente por hábitat, localidad geográfica, especies asociadas, crecimiento en cultivo y capacidad de formación de ectomicorrizas en cultivo puro. La producción de inóculo se ha realizado en un substrato de turba-vermiculita (inóculo vegetativo) y mediante la inclusión en un gel de alginato.

3.2.1.1 Inóculo vegetativo

La utilización de un soporte físico fertilizado para el crecimiento del hongo y su incorporación posterior al sustrato o suelo del vivero, ha constituido un método clásico para la producción y aplicación de inóculo de hongos ectomicorrízicos. Moser (1958) utilizó este método en Austria para la producción de *Suillus plorans* en un sustrato de turba humedecida con solución nutritiva. Esta misma técnica fue utilizada posteriormente para *Suillus placides*, *S. grevillei*, *S. aeruginascens*, *Paxillus involutus*, *Phlegmacium glaucopus*, *Amanita muscaria* y *Lactarius porninsis* (Moser 1959a, 1963). También en Austria, Gölb (1975) utilizó micelio cultivado en granos de cereales esterilizados que posteriormente mezclaba con turba enriquecida con nitrógeno y carbohidratos. Mediante este método se produjo inóculo de *Suillus plorans*, *S. grevillei*, *Boletinus cavipes*, *Amanita muscaria* y *Hebeloma crustuliniforme*.

La técnica de Moser fue modificada en Argentina por Takacs (1967), quien utilizó como sustrato de crecimiento una mezcla de granos de cereales germinados y turba, enriquecidos con solución nutritiva, para la producción de inóculo de *Amanita verna*, *Suillus granulatus*, *S. luteus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Russula* sp., *Scleroderma verrucosum* y *S. vulgare*. Theodorou (1967) y Theodorou y Bowen (1970) utilizaron una mezcla de vermiculita, salvado y maíz, enriquecida con solución nutritiva para la producción de inóculo de *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus*, *S. luteus* y *Cenococcum geophilum*. HacsKaylo y Vozzo (1967) utilizaron en Estados Unidos la técnica general descrita por Moser (1963) para la producción de inóculo de *Cenococcum geophilum*, *Corticium bicolor*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus cothuranatus* en un sustrato de turba y vermiculita enriquecido con solución nutritiva. Le Tacon y Valdenaire (1980) utilizaron inóculo de *Hebeloma cylindrosporum* y *Boletus granulatus* producido en turba y vermiculita para la inoculación de viveros franceses.

Marx (1980) probó varios métodos para la producción de inóculo de *Pisolithus tinctorius*, *Thelephora terrestris* y *Cenococcum geophilum*. La producción en sustratos a base de granos de cereales presentó muchos problemas de contaminaciones con hongos saprófitos y patógenos tras la incorporación del inóculo al suelo. La producción de inóculo en un sustrato de turba y vermiculita humedecido con medio líquido MMN ofreció excelentes resultados. Marx y Bryan (1975) utilizaron las proporciones de 1400 ml. de vermiculita y 50 ml. de turba mezcladas y humedecidas con 750 ml. de MMN líquido en recipientes de cristal autoclavables que permitían el mantenimiento de la humedad del sustrato. La incorporación del hongo como cultivo iniciador del inóculo, puede realizarse añadiendo discos de micelio extraídos a partir de colonias creciendo en agar o mediante cultivos líquidos. El tiempo de incubación para hongos de crecimiento rápido se sitúa entre los 2 y 3 meses, aunque algunos hongos de crecimiento lento como *Cenococcum geophilum* pueden tardar hasta 10 meses en colonizar el sustrato (Marx y Kenney 1982). Antes de incorporar el inóculo al sustrato, algunos autores recomiendan lavarlo con agua para eliminar el exceso de nutrientes (Marx 1980) y secarlo para eliminar el exceso de agua (Marx y Rowan 1981).

La producción de inóculo vegetativo comercial fue desarrollada inicialmente para *Pisolithus tinctorius* (Marx 1980, Smith 1982). El inóculo producido tenía como características la protección del micelio en las partículas de turba y vermiculita, un pH entre 4.5 y 6, niveles bajos de contaminación bacteriana y fúngica probablemente debida a la manipulación durante el lavado y secado, y niveles bajos de glucosa residual. Actualmente se produce inóculo comercial de *Pisolithus tinctorius* en bolsas de plástico conteniendo una mezcla de turba y vermiculita con una proporción de nutrientes ajustada para ser totalmente consumida por el hongo, eliminando así la necesidad de lavar y secar el inóculo (Marx et al. 1991).

La producción de inóculo vegetativo comercial de hongos

ectomicorrícicos en Estados Unidos fue iniciada en 1976 para *Pisolithus tinctorius* por el "Institute for Mycorrhizal Research and Development" (IMRD) y "Abbott Laboratories", North Chicago, Illinois. La serie de estudios cronológicos entre 1977 y 1980 que llevaron a la producción de inóculo comercial de *Pisolithus tinctorius* y a su aplicación en viveros fue publicada por Marx et al. (1982) para viveros en contenedor y por Marx et al. (1984b) para viveros a raíz desnuda. Posteriormente, una sociedad especializada en la producción de champiñones (Sylvan Spawn Laboratory) inició la producción de inóculo vegetativo de *P. tinctorius* que fue comercializado en 1984 por Mycorr Tech, Inc. en la Universidad de Pittsburgh en Pennsylvania. En 1987 se inocularon 5 millones de pinos con este tipo de inóculo.

En Francia, los objetivos de la producción de inóculo vegetativo comercial son dos: la producción de plantas para reforestación inoculadas con *Laccaria bicolor* y *Hebeloma crustuliniforme*, y la producción de plantas inoculadas con *Suillus granulatus* para la obtención de esporocarpos comestibles (Le Tacon et al., 1988). La compañía francesa Somycel (también especializada en la producción de champiñones) inició la producción de inóculo del hongo ectomicorrícico *Laccaria bicolor*. La Sociedad Forestar comercializó el inóculo en 1989 bajo etiqueta del INRA, aunque la producción se detuvo posteriormente por problemas en la calidad del inóculo producido.

El estudio que se expone a continuación se ha diseñado para establecer la efectividad de la inoculación de abeto de Douglas, producido en contenedor, con inóculo vegetativo obtenido a partir de distintos hongos ectomicorrícicos seleccionados, y aplicado a distintas dosis.

3.2.1.1.1 Material y Métodos

Para la producción de plantas se utilizaron semillas de abeto de

Douglas origen 261 (lote nº 313-1980) procedentes de Oregon (EE.UU.). Las semillas se lavaron durante 12 horas con agua corriente y se desinfectaron superficialmente con H₂O₂ 30% durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, se lavaron con agua corriente y se colocaron en pequeños grupos en el interior de bolsas de plástico cerradas durante 35 días a 5°C para su estratificación.

El inóculo vegetativo se produjo a partir de aislamientos de hongos ectomicorrízicos previamente seleccionados por su capacidad de formación de ectomicorrizas en cultivo puro (Tabla 2.2.(a)). Los aislamientos utilizados y los datos de recolección se presentan en la Tabla 3.2.1.(a). Los esporocarpos a partir de los que se realizaron los aislamientos se encuentran depositados en la micoteca del Centro de Cabrils del IRTA (Ctra. de Cabrils s/n., 08343 Cabrils (Barcelona)).

Los aislamientos fúngicos se cultivaron durante un mes en placas de Petri con medio MMN agarificado. Seguidamente, se tomaron las colonias con un escalpelo estéril y se introdujeron en el recipiente metálico esterilizado de un homogeneizador Waring blender con 150 ml. de agua destilada estéril. Las colonias se trituraron durante 10 s. y se obtuvo un homogeneizado miceliar para cada especie que constituyó el cultivo líquido iniciador para la producción de inóculo.

La preparación del inóculo se realizó en botellas de Pyrex de 2 l. con tapón de rosca a las que se añadieron 1100 ml. de vermiculita y 100 ml. de turba mezcladas de manera homogénea y humedecidas con 600 ml. de MMN líquido ajustado a pH 5.5. Estas proporciones representan una modificación de la técnica descrita por Marx y Bryan (1975), adaptada a las características particulares de los substratos y recipientes utilizados. Las botellas preparadas de este modo, se autoclavaron durante 20 minutos a 120°C y 1 Kg./m² de presión. Al final de la esterilización, toda la parte líquida quedó incluida en el interior de las partículas de vermiculita, formando pequeñas cavidades de aire entre las partículas. Estas condiciones facilitan el desarrollo del hongo.

TABLA 3.2.1.(a)

Aislamientos de hongos ectomicorrícicos utilizados para la producción de inóculo vegetativo.

ESPECIE	Nº CULT	LOCALIDAD	AÑO RECOL.	ESPECIE ASOC. *
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	S-20	U.K.	?	?
<i>H. sinapizans</i>	A-126	Barcelona	1990	P.abi
<i>Laccaria bicolor</i>	S-238	U.S.A.	1982	L.occ
<i>L. laccata</i>	A-127	Girona	1989	Q.ile
<i>Lyophyllum decastes</i>	A-71	Oviedo	1986	P.rad
<i>Paxillus involutus</i>	A-87	Pontevedra	1986	C.sat
<i>Pisolithus tinctorius</i>	A-93	Girona	1986	Q.sub
<i>R. roseolus</i>	A-96	Tarragona	1987	P.syl
<i>R. subareolatus</i>	A-116	Girona	1987	P.men
<i>R. vulgaris</i>	A-56	Oviedo	1986	P.rad
<i>Suillus bovinus</i>	A-75	Pontevedra	1986	C.sat
<i>S. bovinus</i>	A-21	Oviedo	1985	P.rad
<i>S. collinitus</i>	I-1	ITALIA	1990	P.nig

(*) C.sat: *Castanea sativa*, L.occ: *Larix occidentalis*, P.abi: *Picea abies*, P.men: *Pseudotsuga menziesii*, P.nig: *Pinus nigra*, P.rad: *Pinus radiata*, P.syl: *Pinus sylvestris*, Q.ile: *Quercus ilex*, Q.sub: *Quercus suber*

La introducción de los cultivos líquidos iniciadores se efectuó unos días después de autoclavar las botellas, tras comprobar la ausencia de contaminantes mediante transferencia de partículas del substrato a placas con MMN. Se dispensaron unos 10 ml. de suspensión miceliar por botella que contenían cantidades variables de micelio en función de la densidad y tamaño de las colonias formadas. Las botellas inoculadas se mantuvieron en una

incubadora a 25°C hasta que todo el sustrato había sido colonizado por el hongo (entre uno y tres meses). Cada botella produjo alrededor de un litro de inóculo al final del período de incubación.

Los contenedores utilizados para el crecimiento de las plantas fueron root-trainers Spencer-Lemaire de 175 cc. de capacidad. El sustrato de crecimiento se produjo a base de una mezcla de turba Floratorf 300 tamizada, y vermiculita (Asfaltex) grado 2 (1:1, v:v) previamente esterilizada en autoclave a 120°C y 1 Kg./cm² de presión durante una hora. El pH de la mezcla tras autoclavar era de 5.5.

Los contenedores se llenaron con una mezcla de inóculo y sustrato combinados en diferentes proporciones para establecer diferentes dosis de aplicación. Las combinaciones probadas fueron 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 (v:v, inóculo:sustrato) y controles no inoculados. La mezcla se realizó a mano, distribuyendo el inóculo de manera homogénea en el sustrato. Una vez preparado el sustrato inoculado, se distribuyó en los contenedores y se introdujeron dos semillas de abeto de Douglas en cada contenedor para asegurar la germinación (el lote de semillas utilizado presentó una germinación del 93% tras 35 días de estratificación). Una vez sembradas las semillas, se cubrieron superficialmente con una fina capa de sustrato. El número total de contenedores preparados fue de 32 por cada dosis probada.

Tras la germinación, se mantuvieron todos los contenedores con una sola planta, extrayendo las sobrantes en los contenedores en los que germinaron las dos semillas, colocándose en un invernadero cuyas condiciones físicas, así como las prácticas de manejo ya fueron descritas en la sección 3.1.

Las plantas se mantuvieron en crecimiento activo entre 14 y 30 semanas, cambiando periódicamente su situación en la banqueta para evitar la exposición prolongada a distintos microambientes que pudieran interferir en los resultados. Al final de cada período de crecimiento, se tomaron datos sobre altura de las plantas, diámetro basal, peso seco de la parte aérea y

radicular y número de raíces cortas infectadas respecto al número total de raíces cortas formadas en un total de 20 plantas tomadas al azar en cada tratamiento.

Los resultados obtenidos para cada aislamiento probado se sometieron a un análisis de la varianza de una vía. En todos los análisis se comprobó la distribución normal y la homogeneidad de las varianzas del error experimental. Los datos de porcentajes de ectomicorrizas fueron modificados por transformación angular ($\arcsin \sqrt{\text{porcentaje} / 100}$) previamente al análisis, para homogeneizar la varianza del error experimental (Snedecor y Cochran 1980). Las diferencias entre medias fueron detectadas por el test de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$). En el caso en que los datos no cumplieran las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3.2.1.1.2. Resultados

De las 13 cepas de hongos ectomicorrícicos probadas, únicamente formaron ectomicorrizas *Hebeloma sinapizans* A-126, *Laccaria bicolor* S-238, *L. laccata* A-127 y *Lyophyllum decastes* A-71 en las condiciones ensayadas. Todos los hongos probados crecieron bien durante la producción de inóculo. La colonización total del substrato en este período tuvo lugar en un tiempo que osciló entre un mes en *Pisolithus tinctorius* y *Rhizopogon* spp., y tres meses en el caso de *Hebeloma sinapizans*.

La formación de micorrizas en *Hebeloma sinapizans* A-126 se representa en la Figura 3.2.1.(a). Todas las dosis probadas (1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 (v:v, inóculo:substrato)) se mostraron efectivas y no se detectaron diferencias significativas entre ellas. El porcentaje de micorrización obtenido fue muy elevado (entre el 70 y el 80 % de las raíces cortas infectadas). Las plantas inoculadas con esta especie no mostraron diferencias significativas con los controles en los parámetros de crecimiento medidos (Figura 3.2.1.(a)),

aunque se detectó una tendencia a la disminución del tamaño de la parte aérea en las plantas inoculadas frente a los controles.

El tiempo de incubación del inóculo de *Laccaria bicolor* S-238 requerido para que el hongo colonizara todo el sustrato fue de dos meses. Este aislamiento formó micorrizas a todas las dosis probadas (1:4, 1:8 y 1:16 (v:v, inóculo:sustrato)). No se detectaron diferencias significativas entre dosis, aunque se observó una tendencia al incremento de la micorrización al bajar la dosis de inóculo (Figura 3.2.1.(b)). El porcentaje de micorrización obtenido osciló entre el 40-50% de las raíces cortas infectadas. Las plantas no mostraron diferencias de crecimiento significativas respecto a los controles, aunque se observó una ligera disminución de la biomasa radicular y del diámetro basal en la dosis 1:4 (Figura 3.2.1.(b)).

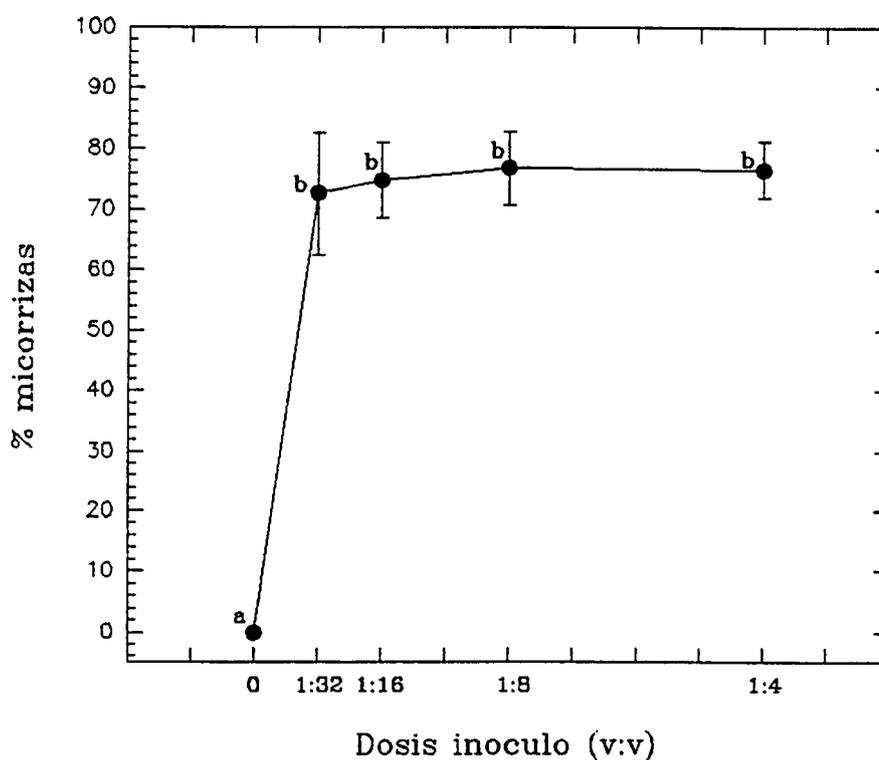
El inóculo de *Laccaria laccata* A-127 se utilizó tras dos meses de incubación. Este aislamiento formó micorrizas a todas las dosis probadas (1:4, 1:8 y 1:16 (v:v, inóculo:sustrato)). El porcentaje de ectomicorrizas aumentó de una manera lineal al aumentar la dosis de inóculo, mostrando diferencias significativas entre la dosis máxima y las dos dosis menores. Las plantas inoculadas con la dosis 1:4 mostraron un máximo de micorrización de un 50 % de las raíces cortas infectadas (Figura 3.2.1.(c)). Las plantas inoculadas mostraron una ligera disminución de los parámetros de crecimiento, excepto en la altura, al aumentar las dosis de inóculo. Las plantas inoculadas con la dosis 1:4 mostraron un desarrollo en altura significativamente mayor que las plantas controles, aunque su diámetro basal fue significativamente menor (Figura 3.2.1.(c)).

El tiempo de incubación del inóculo de *Lyophyllum decastes* A-71 fue de dos meses. Todas las dosis probadas (1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 (v:v, inóculo:sustrato)) resultaron efectivas en la formación de ectomicorrizas y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. El porcentaje de ectomicorrizas formado fue muy bajo y osciló entre el 10 - 20% de las raíces cortas infectadas (Figura 3.2.1.(d)). Las plantas inoculadas mostraron una

FIGURA 3.2.1.(a)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con inóculo vegetativo de *Hebeloma sinapizans* A-126. Periodo de crecimiento tras inoculación: 18 semanas.

DOSIS INOCULO (v:v)	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL (mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
1:4	20.7 ab	2.20 a	1.06 a	0.47 a	1.53 a
1:8	19.4 a	2.17 a	1.07 a	0.49 a	1.56 a
1:16	22.0 ab	2.24 a	1.27 a	0.46 a	1.73 a
1:32	20.7 ab	2.14 a	1.07 a	0.45 a	1.53 a
CONTROL	23.1 b	2.39 a	1.20 a	0.49 a	1.69 a



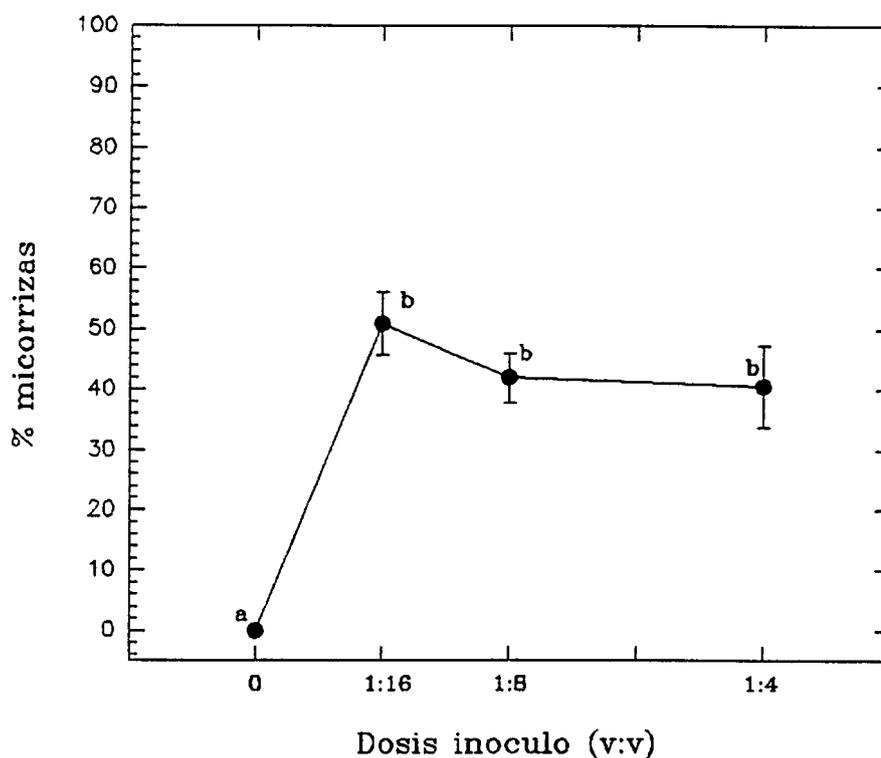
Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(b)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con inóculo vegetativo de *Laccaria bicolor* S-238.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 28 semanas

DOSIS INOCULO (v:v)	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL (mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
1:4	25.6 b	3.05 a	1.54 a	0.83 a	2.37 a
1:8	21.0 a	3.54 b	1.40 a	1.26 b	2.66 a
1:16	23.0 ab	3.43 ab	1.56 a	1.09 ab	3.65 a
CONTROL	23.1 ab	3.65 b	1.73 a	1.26 b	2.99 a



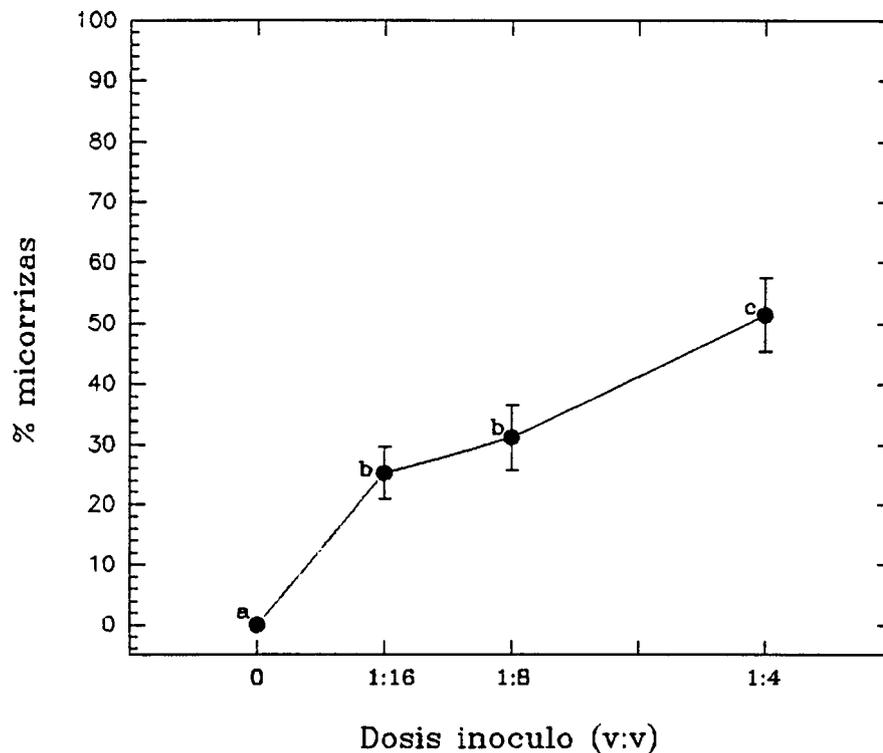
Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(c)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con inóculo vegetativo de *Laccaria laccata* A-127.

Período de crecimiento tras inoculación: 28 semanas.

DOSIS INOCULO (v:v)	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL (mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
1:4	27.7 b	3.21 a	1.79 a	0.97 a	2.77 a
1:8	26.0 b	3.39 ab	1.78 a	1.11 a	2.90 a
1:16	23.9 ab	3.68 b	1.75 a	1.25 a	3.00 a
CONTROL	23.1 a	3.65 b	1.73 a	1.26 b	2.99 a



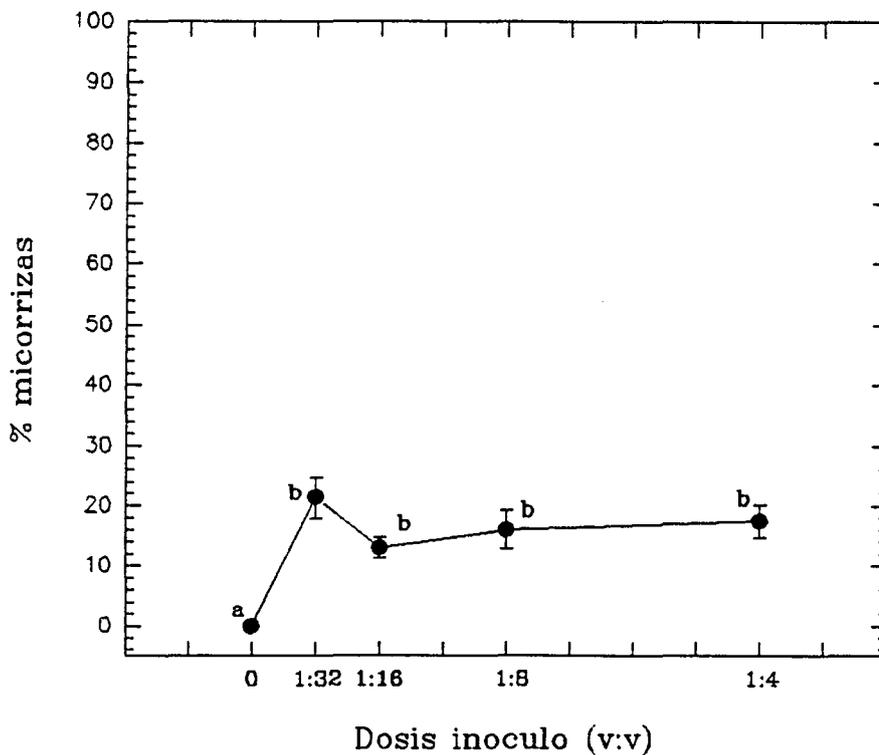
Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(d)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con inóculo vegetativo de *Lyophyllum decastes* A-71.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 14 semanas.

DOSIS INOCULO (v:v)	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL(mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
1:4	15.3 ab	1.88 a	0.64 ab	0.31 ab	0.95 ab
1:8	16.4 b	2.04 a	0.79 b	0.37 ab	1.16 ab
1:16	14.1 ab	1.79 a	0.64 ab	0.37 ab	1.01 ab
1:32	12.3 a	1.70 a	0.49 a	0.29 a	0.79 a
CONTROL	15.5 ab	2.09 a	0.84 a	0.44 b	1.28 b



Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

menor biomasa que las plantas control, siendo estas diferencias significativas en los parámetros de biomasa radicular y biomasa total para la dosis 1:32 (Figura 3.2.1.(d)).

La morfología de las ectomicorrizas formadas por las distintas especies no difirió de las sintetizadas en cultivo puro, por lo que las descripciones son esencialmente iguales a las que se presentaron en la sección 2.3. Las plantas no inoculadas presentaron un sistema radicular totalmente libre de hongos simbioses al final del experimento.

3.2.1.1.3 Discusión

Del total de 13 aislamientos seleccionados por su capacidad de formación de ectomicorrizas en cultivo puro y probados para la inoculación de plantas de abeto de Douglas en contenedor, únicamente cuatro formaron ectomicorrizas. La formación de ectomicorrizas de algunos hongos en condiciones asépticas y la falta de efectividad en condiciones no asépticas es un fenómeno que ha sido descrito por varios autores (Molina 1980; Shaw et al. 1982; Danielson et al. 1984).

De las dos especies de *Hebeloma* probadas, únicamente resultó efectiva *H. sinapizans*, mientras que *H. cylindrosporum* no formó micorrizas en las condiciones de ensayo. *Hebeloma sinapizans* mostró una elevada infectividad incluso a dosis bajas de inóculo. Este aislamiento mostró un umbral de micorrización (alrededor del 75 %) a partir del cual no aumentó el número de micorrizas al aumentar la dosis de inóculo. La efectividad de este aislamiento lo convierte en un buen candidato para su utilización en vivero, aunque el mayor problema para su obtención reside en su lenta tasa de crecimiento en cultivo puro. El género *Hebeloma* no había sido previamente utilizado para la inoculación de abeto de Douglas en contenedor, aunque *H. crustuliniforme* y *H. cylindrosporum* habían sido utilizados previamente como inóculo vegetativo en viveros de abeto de Douglas a raíz

desnuda (Le Tacon et al. 1985; Le Tacon et al. 1988).

Las dos especies de *Laccaria* probadas formaron un porcentaje de micorrización máximo de un 50 %, aunque *L. bicolor* se mostró más efectiva a dosis bajas que *L. laccata*. La cepa S-238 de *L. bicolor* ha sido ampliamente utilizado por varios autores y se conocen datos sobre su efectividad con distintas especies arbóreas en viveros a raíz desnuda (Le Tacon et al. 1988), así como su efecto en la supervivencia y crecimiento de las plantas en plantación (Le Tacon et al. 1991). El uso de la cepa S-238 de *Laccaria bicolor* como inóculo vegetativo ha resultado igualmente efectivo, incluso a bajas dosis, en la inoculación de abeto de Douglas producido en contenedor en Estados Unidos (Molina 1982; Hung y Molina 1986b; Hung y Trappe 1987).

Lyophyllum decastes fue probado por primera vez como inóculo y formó unas micorrizas muy similares a las de *Laccaria* sp. a todas las dosis, aunque en un porcentaje bajo (alrededor del 20 %).

La falta de efectividad del inóculo vegetativo de *Rhizopogon* spp. y *Suillus* spp. había sido descrita por Molina (1980). La inoculación con distintas especies dentro de estos géneros ha sido efectiva en algunos ensayos de inoculaciones a raíz desnuda en *Pinus* spp. (Moser 1959c; Theodorou y Bowen 1970; Vozzo y Hacskaylo 1971) y en contenedor con *Quercus* spp. (Dixon et al. 1984). Entre las posibles causas de la falta de efectividad del inóculo vegetativo de *Rhizopogon* y *Suillus* se ha sugerido la sensibilidad a la manipulación del inóculo durante su preparación y la falta de adaptación a la permanencia en el sustrato en condiciones saprofíticas hasta la formación de raíces cortas (Molina 1980).

La inoculación de abeto de Douglas con inóculo vegetativo de *Paxillus involutus* en contenedor únicamente había sido probada previamente por Molina (1980), obteniendo un porcentaje muy bajo de plantas micorrizadas.

La falta de efectividad en la inoculación de abeto de Douglas con inóculo vegetativo de *Pisolithus tinctorius* en este ensayo coincide con los

resultados obtenidos en tres viveros a raíz desnuda en Estados Unidos (Marx et al. 1984b). Sin embargo, los resultados de las inoculaciones de la misma especie arbórea en contenedor han sido inconsistentes, variando desde la baja o nula efectividad (Molina 1980; Hung y Molina 1986a; Hung y Trappe 1987) hasta la formación más o menos abundante de micorrizas (Molina 1979b; Marx et al. 1982; France y Cline 1987). La diferencia de efectividad entre distintos ecotipos de *Pisolithus tinctorius* fue demostrada por Molina (1979b). Entre las causas de los resultados inconsistentes de *Pisolithus tinctorius* podría estar la pérdida de la capacidad micorrícica que puede derivar del mantenimiento de la cepa en cultivo puro, con sucesivas transferencias durante un período largo de tiempo (Marx 1981). Otra posibilidad a considerar es la existencia de algún tipo de especificidad en determinadas localidades como sugirió Marx (1980), a pesar del amplio rango de plantas huésped que pueden ser micorrizadas por esta especie de hongo (Marx 1977b).

El crecimiento de las plantas en las condiciones experimentales ensayadas ha superado, a partir de los 7 meses de edad, los valores morfológicos considerados como objetivo en viveros comerciales americanos de abeto de Douglas para plantas 1+0, consistentes en una altura de 11.5 cm. y un diámetro basal de 3 mm. (Duryea y Landis 1984). Los resultados de crecimiento obtenidos en las plantas micorrizadas y no micorrizadas no han mostrado en general diferencias significativas. En algunos casos, la ligera disminución del crecimiento observada podría deberse al consumo elevado de fotosintatos por parte del hongo o al cambio en las condiciones del sustrato de crecimiento, provocado por un aumento de vermiculita en el sustrato en las inoculaciones a dosis elevadas. La micorrización en condiciones de contenedor con sustrato artificial y la utilización de fertilizantes solubles raramente ha incrementado el crecimiento de las plantas micorrizadas en la fase de vivero en ensayos precedentes (Marx y Barnett 1974; Molina 1979b, 1980).

3.2.1.2. Inóculo incluido en gel de alginato polimerizado

Le Tacon et al. (1983) propusieron un nuevo método para la producción de inóculo vegetativo de hongos ectomicorrícicos, consistente en la producción del micelio en fermentadores y su inclusión en un gel de polímeros. Esta técnica fue propuesta inicialmente para la producción de diferentes microorganismos (Le Tacon et al. 1983).

La técnica de producción de inóculo de hongos ectomicorrícicos mediante la inclusión del micelio en geles de polímeros se inició con *Hebeloma cylindrosporum* (Le Tacon et al. 1983, 1985). Estos autores produjeron inóculo a partir de micelio cultivado en fermentador que se aplicó de tres formas distintas: 1.) directamente, 2.) en substrato de turba y vermiculita y 3.) incluido en alginato de sodio mezclado con sílice macroporoso o sepiolita. La inclusión en alginato se realizó mediante la incorporación del micelio obtenido en un fermentador a una solución de 10 g./litro de alginato de sodio y agua. A esta solución se añadió una solución concentrada de CaCl_2 que provocó la polimerización inmediata del gel a causa de la reticulación del alginato por la substitución de los iones Na^+ por iones Ca^{2+} . La polimerización de la mezcla de alginato y micelio también ha sido realizada mediante su incorporación gota a gota en una solución concentrada de CaCl_2 , con lo que se obtienen pequeñas bolas sólidas de 2 a 3 mm. de diámetro que pueden ser utilizables directamente.

Los resultados obtenidos en los primeros ensayos indicaron que el micelio incluido en polímeros mantuvo la infectividad durante más tiempo que el inóculo de turba y vermiculita. Aunque la micorrización de las plantas no mostró diferencias entre los dos tipos de inóculo, sí se detectó un incremento de los parámetros de crecimiento de las plantas inoculadas con micelio incluido en polímeros. Este efecto es probablemente debido a la alta actividad metabólica del micelio activo producido en fermentadores y protegido en gel de alginato (Le Tacon et al. 1985). Littke et al. (1980) demostraron que

las hifas que se encuentran en crecimiento activo tienen un nivel de ATP más alto que las hifas de 3 ó 4 semanas, lo cual puede ser un indicador del potencial de infección del micelio.

Mauperin et al. (1987) recomendaron la utilización del gel de alginato a baja concentración para la inclusión del hongo, ya que el gel resultante mantiene una porosidad óptima para el intercambio de gases y se minimizan los posibles efectos perjudiciales.

La viabilidad del inóculo de *Hebeloma crustuliniforme* incluido en gel de alginato ha sido probada en distintas condiciones (Mauperin et al. 1987). La viabilidad del inóculo no varió con el tiempo de permanencia de las gotas polimerizadas en una solución 0.7 M de CaCl_2 ni con la adición de turba finamente dividida o bentonita al gel. La adición de turba o bentonita incrementó la retención de agua del gel aunque sólo la bentonita disminuyó la pérdida de agua por evaporación. Sin embargo, la supervivencia del inóculo fue mejor cuando se incluyó turba en el gel. En condiciones de humedad, la viabilidad del inóculo se mantuvo al menos cinco meses, mientras que una desecación parcial de las gotas polimerizadas disminuyó el tiempo de conservación a un mes.

Mortier et al. (1988) compararon la efectividad del inóculo de *Laccaria bicolor* producido en turba-vermiculita con el producido en alginato en un vivero a raíz desnuda de abeto de Douglas. La cantidad de micelio utilizado fue similar en ambos tipos de inóculo (de 2 a 5 g. de peso seco por m^2). El porcentaje de micorrización obtenido y el incremento del desarrollo de las plantas resultaron mayores con el inóculo de alginato que con el inóculo de turba y vermiculita. La mayor supervivencia del inóculo de alginato permitió un efecto más duradero en la producción de infecciones primarias que el inóculo de turba y vermiculita, cuya capacidad infectiva no se mantuvo por encima de las 15 semanas. La incidencia de necrosis radiculares causadas por *Fusarium oxysporum* fue menor en las plantas inoculadas con inóculo de alginato de sodio que en plantas inoculadas con inóculo de turba y vermiculita.

La totalidad de los trabajos realizados con en gel de alginato como forma de inóculo se han realizado en viveros a raíz desnuda. En este estudio se pretende probar esta técnica por primera vez en plantas producidas en contenedor. Los objetivos de este ensayo son:

- puesta a punto de las técnicas de producción de inóculo en forma de gel de alginato para distintas especies de hongos ectomicorrícicos.
- optimización de las condiciones de producción para maximizar la viabilidad del inóculo.
- determinación de la efectividad de inóculo en la formación de ectomicorrizas con plantas de abeto de Douglas producidas en contenedor y establecimiento de las dosis óptimas de inóculo.

3.2.1.2.1 Material y Métodos

Producción de micelio de hongos ectomicorrícicos seleccionados e inclusión en alginato de sodio.

Las cepas utilizadas en este ensayo fueron: *Laccaria bicolor* S-238, *Pisolithus tinctorius* A-93 y *Rhizopogon subareolatus* A-116. Los datos de aislamiento y recolección de estos hongos se describen en la Tabla 3.2.1.(a). Las tres cepas ya habían sido probadas en síntesis en cultivo puro con resultados que indicaban un elevado porcentaje de formación de micorrizas (Tabla 2.3.(b)).

Los aislamientos se cultivaron previamente en placas de Petri con medio MMN (Marx 1969) durante 25 días. Posteriormente se prepararon suspensiones de micelio para cada hongo a partir de la trituración de las colonias en un homogeneizador Waring blender equipado con un recipiente metálico, previamente esterilizado conteniendo 150 ml. de agua destilada. En total se añadieron siete colonias de cada aislamiento que se trituraron a baja

velocidad durante 10 s. A continuación y para cada hongo, se dispensaron 10 ml. de la suspensión micelar obtenida en 10 botellas de Pyrex de 250 cc. esterilizadas (10 ml. por botella), que contenían 100 ml. de solución nutritiva MMN modificada con 5 g./l. de glucosa. Las botellas se incubaron a 25°C en cultivo estático durante 21 días, al final de los cuales se produjo un crecimiento micelar abundante y de aspecto algodonoso.

El micelio se obtuvo por filtración con una malla fina esterilizada, eliminando el exceso de nutrientes mediante lavado con agua destilada estéril. Posteriormente, se obtuvo el peso fresco del micelio para cada hongo, cuyos valores promedio para 100 ml. de solución nutritiva fueron los siguientes: 1.34 g. de *Laccaria bicolor* S-238, 1.92 g. de *Pisolithus tinctorius* A-93 y 1.03 g. de *Rhizopogon subareolatus* A-116.

El alginato de sodio utilizado pertenece a la serie SOBALG FD 100 (valor de granulometría y viscosidad: 174). Este compuesto procede del alga parda *Laminaria* y se utiliza habitualmente en aplicaciones alimentarias.

Se prepararon soluciones de 1 y 2% de alginato de sodio comercial en agua destilada, agitándose la mezcla hasta que la consistencia de la solución se volvió viscosa. Posteriormente se autoclavó (120°C; 1 Kg./m² de presión) durante 20 minutos. Una vez enfriado, se añadieron 40 g./l. de turba estéril triturada y 10 g. de micelio de peso fresco de micelio triturado por litro de alginato.

Las botellas conteniendo la solución de alginato, turba y micelio se mantuvieron en un agitador provisto de imán giratorio bajo cabina de flujo laminar. Su contenido se dispensó gota a gota mediante una bomba peristáltica con el tubo esterilizado sobre una cubeta de poca profundidad conteniendo una solución concentrada de CaCl₂ previamente esterilizada. Se utilizaron tres concentraciones de CaCl₂: 0.3 M, 0.5 M y 0.7 M. Las gotas que cayeron sobre la solución de cloruro cálcico polimerizaron instantáneamente y se mantuvieron en la solución durante 30 minutos para que la polimerización alcanzase la zona central. Las gotas polimerizadas sólidas se recogieron con

una red metálica esterilizada y se guardaron en bolsas de plástico a 5°C hasta su utilización.

Al final del proceso se obtuvo micelio incluido en gel de alginato a dos concentraciones de alginato de sodio (1 y 2 g./ l.) y polimerizado en tres concentraciones de CaCl_2 (0.3, 0.5 y 0.7 M.). En total, se prepararon 6 variaciones de inóculo para cada uno de los tres hongos probados.

Viabilidad del inóculo incluido en gel de alginato.

Una parte del inóculo preparado se sembró en placas de Petri conteniendo medio MMN a razón de 20 gotas polimerizadas por placa y tres replicados por tipo de inóculo, lo que supuso un total de 54 placas. Las placas se mantuvieron durante un mes en incubación y fueron controladas periódicamente para contar y extraer las gotas polimerizadas que mostraron crecimiento miceliar. El resto de las gotas polimerizadas se mantuvo en refrigeración a 5°C en bolsas de plástico cerradas. Este ensayo se repitió periódicamente con el mismo inóculo hasta cinco meses después de su producción para detectar una posible pérdida de viabilidad del micelio incluido en el polímero.

En este ensayo se consideran los factores de producción del inóculo (concentraciones de alginato y de CaCl_2) y tiempo, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de producción para mantener la viabilidad del inóculo. Los datos de viabilidad se expresaron en porcentaje de gotas polimerizadas con crecimiento miceliar del total de las sembradas para cada tipo de inóculo.

Inoculación de abeto de Douglas en contenedor y determinación de la dosis óptima de inóculo.

La producción de plantas de abeto de Douglas para su inoculación se

realizó a partir de semillas de abeto de Douglas (origen 261, lote n° 313-1980) que se esterilizaron superficialmente con H₂O₂ 30 % y se estratificaron durante 35 días a 5°C. Las plantas de abeto de Douglas pregerminadas en semillero se trasplantaron a contenedores Spencer Lemaire root-trainers de 175 cc. de capacidad. Los contenedores se llenaron con una mezcla de turba y vermiculita (1:1, v:v) previamente esterilizada en autoclave (120°C; 1 Kg./cm² de presión), y mezclada con distintas proporciones de inóculo.

El inóculo de alginato se mezcló a mano con el sustrato para uniformizar su dispersión. Las concentraciones de inóculo probadas para cada uno de los tres hongos estudiados fueron: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 (v:v, inóculo : sustrato) y un tratamiento control consistente en alginato sin micelio incluido. En total se prepararon 416 contenedores que representaban 32 contenedores para cada tratamiento.

Las plantas se mantuvieron durante cuatro meses en crecimiento vegetativo, cambiando periódicamente su posición en las banquetas del invernadero. Las condiciones ambientales y de manejo de las plantas fueron descritas en la sección 3.1.

Tras el período de crecimiento, se extrajeron las plantas de los contenedores y se registraron los parámetros de crecimiento (altura, diámetro basal y biomasa aérea y radicular) así como el porcentaje de micorrización de las raíces cortas de 20 plantas tomadas al azar de cada tratamiento.

Los datos de crecimiento de las plantas y el grado de micorrización de sus raíces para cada hongo estudiado, se analizaron mediante análisis de la varianza de una vía. Previamente, se realizó la transformación angular de los datos de porcentajes de micorrización (arco seno $\sqrt{\text{porcentaje} / 100}$) y se comprobó la distribución normal y homogeneidad de las varianzas del error experimental (Snedecor y Cochran 1980). Las diferencias entre medias se detectaron por el test de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos que no cumplieron las condiciones de normalidad y homogeneidad de las varianzas se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3.2.1.2.2. Resultados

La polimerización del inóculo tuvo lugar a las dos concentraciones de alginato probadas en las tres concentraciones de cloruro cálcico. Las gotas polimerizadas utilizando alginato al 1% presentaron una menor consistencia que las formadas con alginato al 2%, independientemente de la concentración de CaCl_2 .

El porcentaje de gotas polimerizadas que mostraron crecimiento micelar de los tres hongos probados, tras la siembra en medio MMN, se expresa en la Tabla 3.2.1.(b). La viabilidad se expresa como el porcentaje de gotas polimerizadas que mostraron crecimiento micelar.

Inmediatamente después de su producción, el inóculo de *Laccaria bicolor* incluido en gel de alginato mantuvo la viabilidad al 100 %, independientemente de la concentración de alginato de sodio utilizado para su preparación y de la concentración de CaCl_2 en la que se realizó la polimerización. Igualmente, el mantenimiento del inóculo en condiciones de refrigeración durante 44 y 160 días a 5°C, no alteró la viabilidad del inóculo.

Pisolithus tinctorius mostró una marcada sensibilidad a la concentración de CaCl_2 y únicamente creció en un porcentaje elevado a partir de las gotas polimerizadas a la concentración más baja (0.3 M). La refrigeración del inóculo durante 44 o más días ocasionó la muerte del hongo.

La viabilidad inicial del inóculo de *Rhizopogon subareolatus* decreció con concentraciones crecientes de CaCl_2 , independientemente de la concentración de alginato de sodio utilizada. Un 100% de las gotas polimerizadas en CaCl_2 0.3 M crecieron en estas condiciones, bajando hasta un mínimo de un 60% cuando se polimerizaron en CaCl_2 0.7 M. Tras su almacenamiento a 5°C, se produjo un descenso de la viabilidad que acentuó el efecto producido por las concentraciones crecientes de CaCl_2 desde una pérdida de viabilidad entre el 30-40% a las concentraciones 0.3 y 0.7 M a

TABLA 3.2.1.(b)

Viabilidad del inóculo de tres hongos ectomicorrícicos incluidos en gel de alginato preparado a 2 concentraciones y polimerizado en 3 concentraciones de CaCl_2 , tras su producción y almacenamiento hasta 160 días a 5°C . Cada valor representa el porcentaje de gotas polimerizadas viables en medio MMN sobre un total de 60.

HONGO	[] ALGINATO	[] CaCl_2	DIAS		
			0	44	160
<i>Laccaria bicolor</i> S-238	1 %	0.3 M	100%	100%	97%
		0.5 M	100%	100%	100%
		0.7 M	100%	100%	100%
	2 %	0.3 M	100%	100%	100%
		0.5 M	100%	100%	100%
		0.7 M	100%	100%	100%
<i>Pisolithus tinctorius</i> A-93	1 %	0.3 M	97%	3%	0
		0.5 M	12%	0	0
		0.7 M	0	0	0
	2 %	0.3 M	88%	0	0
		0.5 M	0	0	0
		0.7 M	3%	0	0
<i>Rhizopogon subareolatus</i> A-116	1 %	0.3 M	100%	80%	76%
		0.5 M	83%	23%	-
		0.7 M	60%	43%	32%
	2 %	0.3 M	100%	88%	97%
		0.5 M	80%	48%	43%
		0.7 M	70%	53%	50%

tiempo 0, hasta del 50% tras 160 días de refrigeración. La viabilidad descendió aproximadamente un 25% en el inóculo polimerizado en CaCl_2 0.3 M y preparado con un 1 % de alginato y se mantuvo cercana al 100% cuando se preparó con un 2% de alginato de sodio tras 160 días de almacenamiento. El resto de concentraciones de CaCl_2 probadas reflejaron una tendencia a la disminución de la viabilidad tras la refrigeración a la concentración de 1% de alginato respecto al 2%. Los datos de 160 días sobre la viabilidad del inóculo de *R. subareolatus* preparado con un 1% de alginato y CaCl_2 0.5 M no se incluyen en la tabla porque se detectaron contaminaciones bacterianas.

De los tres aislamientos probados para la formación de ectomicorrizas en abeto de Douglas producido en contenedor, únicamente el aislamiento de *Laccaria bicolor* S-238 resultó efectivo. La formación de micorrizas se produjo a todas las dosis probadas (Figura 3.2.1.(e)). Las tres dosis más elevadas (1:10, 1:20 y 1:40) produjeron un porcentaje de micorrizas cercano al 70% de las raíces cortas infectadas, sin detectarse diferencias significativas entre ellas. A la dosis 1:80, el porcentaje de micorrizas formadas fue ligeramente superior al 50% , resultando significativamente menor que el obtenido a la dosis 1:40.

El crecimiento de las plantas inoculadas fue similar al de las plantas no inoculadas. El mejor crecimiento se obtuvo a la dosis 1:40, aunque estadísticamente, la única diferencia significativa se obtuvo en la biomasa aérea (Figura 3.2.1.(e)).

3.2.1.2.3. Discusión

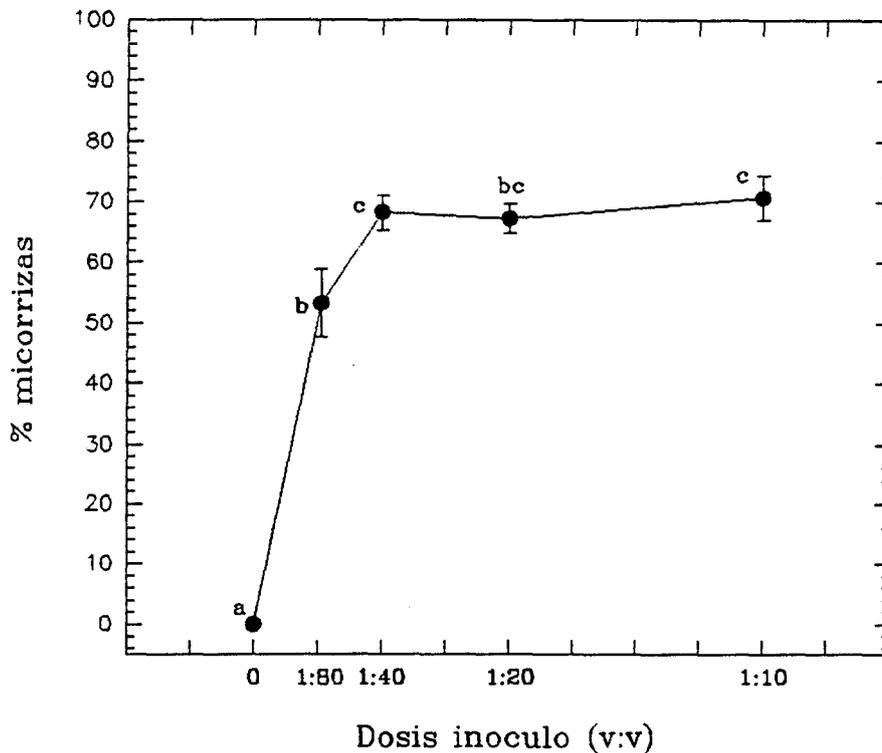
Los estudios sobre almacenamiento de inóculo de hongos ectomicorrícicos son escasos en la literatura a pesar de su importancia en la producción comercial (Marx et al. 1982). Los ensayos de viabilidad de inóculo de hongos ectomicorrícicos incluido en gel de alginato habían sido realizados únicamente para *Hebeloma crustuliniforme* (Mauperin et al.

FIGURA 3.2.1.(e)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con inóculo de alginato de *Laccaria bicolor* S-238.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 16 semanas.

DOSIS INOCULO (v:v)	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL (mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
1:10	19.9 a	1.78 a	0.67 ab	0.35 a	1.02 a
1:20	23.8 a	1.94 a	0.88 ab	0.39 a	1.28 a
1:40	23.1 a	2.10 a	0.91 b	0.41 a	1.32 a
1:80	23.3 a	2.00 a	0.83 ab	0.38 a	1.22 a
CONTROL	19.6 a	1.85 a	0.65 a	0.32 a	0.97 a



Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

1987), en los que se observó su tolerancia a elevadas concentraciones de CaCl_2 y el mantenimiento de la viabilidad del inóculo refrigerado en condiciones húmedas durante 5 meses. Los resultados obtenidos en este ensayo sobre la viabilidad del inóculo de *L. bicolor* S-238 muestran igualmente una tolerancia a todas las concentraciones de alginato y de CaCl_2 utilizadas sin que su capacidad de crecimiento sea alterada tras 160 días a 5°C . La viabilidad del inóculo vegetativo comercial de la cepa S-238 de *L. bicolor* tras un período de almacenamiento fue estudiada por Hung (1984) que observó un mantenimiento en la capacidad de formación de ectomicorrizas más prolongado tras el almacenamiento en frío que a temperatura ambiente.

La tolerancia de *L. bicolor* a la refrigeración y a elevadas concentraciones de CaCl_2 contrasta con los resultados obtenidos para *P. tinctorius* A-93 en los que se observó que las concentraciones de CaCl_2 iguales o superiores a 0.5 M provocaron la mortalidad del hongo. Igualmente, este hongo mostró una elevada sensibilidad al almacenamiento, con pérdida prácticamente total de viabilidad tras 44 días en refrigeración. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Maronek y Hendrix (1980) y Hung (1984) que detectaron la pérdida de viabilidad de *P. tinctorius* tras su almacenamiento en frío. Sin embargo, las micorrizas de esta especie pueden mantener la viabilidad durante al menos cuatro meses cuando se almacena la planta huésped a 5°C (Marx 1979).

La viabilidad de *R. subareolatus* mostró una disminución gradual al aumentar la concentración de CaCl_2 que se fue acentuando al aumentar el tiempo de almacenamiento en frío. No existen en la literatura estudios previos sobre la viabilidad de inóculo vegetativo de *Rhizopogon* spp.; sin embargo, las suspensiones de esporas de algunas especies pueden mantenerse al menos hasta siete meses sin pérdida de capacidad germinativa de las esporas (Castellano et al. 1985).

Los estudios previos sobre la utilización de inóculo de alginato se

realizaron con especies tolerantes a altas concentraciones de CaCl_2 y no se detectó la posible sensibilidad de determinados aislamientos. Los resultados obtenidos en este ensayo, indican la existencia de distintos niveles de tolerancia al CaCl_2 entre distintas especies de hongos ectomicorrícicos, por lo que es recomendable el estudio previo para cada hongo de la concentración máxima tolerable de CaCl_2 que permita realizar la polimerización. La utilización de concentraciones bajas de CaCl_2 para polimerizar el alginato requiere la renovación periódica de la solución para reponer los iones Ca^{2+} .

La sensibilidad al almacenamiento en frío es también dependiente de la especie implicada, aunque la tolerancia de *R. subareolatus* es mayor si se realiza la polimerización a bajas concentraciones de CaCl_2 . La concentración de alginato al 2 % produce una polimerización más consistente y no se ha detectado una pérdida de viabilidad acusada en los aislamientos probados debida a este factor, por lo que es preferible a la concentración del 1 %.

La inoculación con inóculo de alginato y el estudio de las dosis óptimas de aplicación se ha realizado por primera vez en contenedor. En viveros a raíz desnuda se había utilizado este tipo de inóculo para *Hebeloma crustuliniforme* (Mauperin et al. 1987), *H. cylindrosporium* (Le Tacon et al. 1983) y *Laccaria bicolor* (Mortier et al. 1988). La inoculación experimental realizada en contenedor fue efectiva únicamente para *L. bicolor* a todas las dosis probadas, demostrando la efectividad de esta cepa aplicada en distintos tipos de inóculo y su efectividad a bajas concentraciones ya demostrada para el inóculo vegetativo (Hung 1984 y sección 3.2.1.1.). Los porcentajes de micorrización obtenidos con este tipo de inóculo fueron mayores que los obtenidos con inóculo vegetativo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mortier et al. (1988) para la misma cepa en viveros a raíz desnuda. La dosis mínima que produjo el máximo porcentaje de micorrizas fue de 1:40 (v:v inóculo:substrato), aunque la dosis de 1:80

produjo una micorrización superior al 50 %. A la dosis óptima (1:40), un litro de inóculo de *L. bicolor* incluido en gel de alginato (10 g. de micelio en peso fresco) puede utilizarse para inocular unas 250 plantas en contenedor.

A diferencia de los resultados obtenidos a raíz desnuda por Mortier et al. (1988), la inoculación con el mismo aislamiento de *L. bicolor* en contenedor no incrementó significativamente el crecimiento de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. Estos resultados son coherentes con los obtenidos con distintos tipos de inóculo en condiciones de contenedor con substratos artificiales en los que se añaden fertilizantes solubles (Marx y Barnett 1974; Molina 1979b; Molina 1980; Landis et al. 1989).

La inoculación con *R. subareolatus* y *P. tinctorius* no resultó efectiva en la formación de ectomicorrizas. Molina (1980) sugirió que la falta de efectividad del inóculo vegetativo de *Rhizopogon* spp. puede deberse a la manipulación durante la inoculación y a la existencia de micelio posiblemente inviable y de crecimiento lento tras la zona de crecimiento activo. La falta de efectividad de *P. tinctorius* puede explicarse por la utilización de una cepa inadecuada para la micorrización de abeto de Douglas. La existencia de un cierto grado de especificidad para este hongo fue observada por Marx (1980) para determinadas cepas de esta especie. Adicionalmente, la manipulación que conlleva la producción de este tipo de inóculo no parece ser adecuada para una especie como *P. tinctorius* que ha mostrado una elevada sensibilidad a la rotura del micelio (Hung y Trappe 1983).

3.2.1. INOCULO EN FORMA DE ESPORAS

La utilización de esporas como inóculo empezó a aplicarse en el siglo XVIII, como consecuencia del interés en la producción de trufas y antes del descubrimiento de la naturaleza de las micorrizas (Trappe 1977). La aplicación consistía en enterrar trozos de esporocarpo que esencialmente constituye un inóculo de esporas, ya que los tejidos fúngicos del esporocarpo no

constituían un inóculo viable.

La obtención de elevadas cantidades de basidiosporas puede realizarse a partir de los esporocarpos maduros de Gasteromicetos principalmente (Theodorou 1971; Theodorou y Bowen 1973; Marx y Bryan 1975; Marx et al. 1976). La obtención de esporas a partir de Agaricales y Afiloforales es más laboriosa y puede realizarse a partir de la esporada de himenios maduros (Marx y Ross 1970; Lamb y Richards 1974a; Richard 1975; Stack et al. 1975).

Las basidiosporas de *Pisolithus tinctorius* han sido utilizadas como inóculo en viveros en contenedor y a raíz desnuda. Este hongo es cosmopolita (Marx 1977b) y forma esporocarpos que suelen ser obtenidos en abundancia (Marx y Bryan 1975), extrayéndose un elevado número de esporas de cada uno de ellos (Marx 1976a). Este tipo de inóculo ha sido utilizado de forma efectiva mezclado con un soporte físico humedecido como vermiculita, arena o caolín, antes de su aplicación en viveros a raíz desnuda (Marx 1976a; Marx et al. 1976; Marx et al. 1978; Marx et al. 1979) y en contenedor (Marx y Barnett 1974; Ruehle y Marx 1977), en forma de suspensión en agua (Marx et al. 1979), pulverizando suspensión esporal en suelo y plantas o en seco (Marx et al. 1979; Ruehle 1980a), en forma de precipitados de esporas (Marx y Bell 1985) y añadidas a un compuesto para encapsular semillas (Marx y Kenney 1982; Marx et al. 1984a).

Los ensayos sobre efectividad del inóculo de esporas de *P. tinctorius* en la estimulación del crecimiento de las plantas en vivero, y el incremento de supervivencia y crecimiento en campo, han sido revisados por Marx (1980) en el sureste de Estados Unidos. Sin embargo, en algunas zonas del oeste y para otras coníferas, los resultados han sido más erráticos (Alvarez y Trappe 1983a, 1983b).

Otras especies de hongos han sido utilizadas en forma efectiva para la inoculación con esporas, generalmente aplicadas en un recubrimiento adhesivo de las semillas o como suspensión en agua. Entre las especies utilizadas se encuentran *Rhizopogon colossus* (Castellano y Trappe 1985;

Castellano et al. 1985), *R. luteolus* (Theodorou 1971; Theodorou y Bowen 1970, 1973; Lamb y Richards 1974a, 1974b; Donald 1975; Azevedo 1982; Ivory y Munga 1983), *R. nigrescens* (Ivory y Munga 1983), *R. roseolus* (Lamb y Richards 1974a, 1974b), *R. vinicolor* (Parke et al. 1983; Castellano y Trappe 1985; Castellano et al. 1985), *S. citrinum* (Azevedo 1982), *Scleroderma texense* (Ivory y Munga 1983), *Suillus granulatus* (Lamb y Richards 1974a, 1974b) y *Thelephora terrestris* (Marx y Ross 1970).

El género *Rhizopogon* resulta de particular interés para las inoculaciones en vivero por la abundancia local de esporocarpos en determinadas zonas, y la especificidad que muestran algunas especies con el abeto de Douglas (Molina y Trappe 1982a). Adicionalmente, se ha demostrado que *Rhizopogon vinicolor* puede inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos de la raíz *in vitro* (Zak 1971) y favorecer la recuperación de plantas sometidas a estrés hídrico (Parke et al. 1983).

La inoculación con esporas presenta ventajas e inconvenientes frente al inóculo vegetativo. Entre las ventajas, se considera que este tipo de inóculo no requiere una fase de crecimiento en cultivo puro, es ligero, puede obtenerse en grandes cantidades y algunas especies pueden tolerar largos períodos de almacenamiento sin ver su viabilidad drásticamente reducida. Entre los inconvenientes, se encuentra la carencia de metodología para determinar la viabilidad de las esporas, la irregular fructificación de esporocarpos, el mayor tiempo requerido para la formación de micorrizas en comparación con el inóculo vegetativo y la falta de definición genética en el inóculo (Marx y Kenney 1982).

La producción comercial de inóculo de esporas se reduce a una compañía de Oregon (EE.UU.) denominada Forest Mycorrhizal Application y a la International Forest Seed Company de Alabama (EE.UU.) que produce semillas encapsuladas con esporas.

Los ensayos de inoculaciones con esporas que se presentan a continuación, han sido realizados a partir de esporas de hongos hipogeos y

de *Pisolithus tinctorius* que han proporcionado suficiente material para la realización de ensayos de dosis.

3.2.1.1. Material y Métodos

Se utilizaron semillas de abeto de Douglas origen 261 (lote nº 313-1980) que se desinfectaron superficialmente con H₂O₂ durante 30 minutos en agitación, y se estratificaron a 5°C durante 35 días.

Los esporocarpos utilizados en el ensayo fueron recolectados sistemáticamente durante varios años en bosques y plantaciones de distintas especies arbóreas, previamente seleccionadas por la presencia de determinadas especies de hongos y la regularidad de fructificación. Las especies utilizadas en los ensayos de inoculación con esporas y los datos de recolección se describen en la Tabla 3.2.1.(c). Parte de las colecciones utilizadas se guardaron en el herbario del Centro de Cabriils del IRTA, Ctra. de Cabriils s/n, 08348 Cabriils (Barcelona).

Tras la recolección, los esporocarpos se identificaron y se limpiaron cuidadosamente con un pincel de cerdas gruesas. Posteriormente se desecaron a 40°C en una estufa con circulación de aire y se guardaron en un sobre de papel en herbario hasta su uso.

Las suspensiones de esporas hidrófilas de *Hymenogaster*, *Melanogaster*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* y *Tuber* se prepararon a partir de esporocarpos secos que fueron macerados en agua durante 12 horas y posteriormente triturados en un homogeneizador Waring blender con 200 ml. de agua a alta velocidad durante varios minutos para la liberación de las esporas. Las esporas obtenidas en la solución madre se contaron con un hematocitómetro y se prepararon soluciones de distintas concentraciones de esporas por dilución en agua. El número total de esporas por gramo de esporocarpo se determinó previamente para realizar los cálculos (Tabla 3.2.1.(d)).

TABLA 3.2.1.(c)

Especies de hongos utilizadas para la obtención de inóculo de esporas.

ESPECIE	LOCALIDAD	AÑO RECOL.	ESPECIE ASOCIADA *
<i>Hymenogaster vulgaris</i>	Girona	1989	P.men
<i>Melanogaster ambiguus</i>	Girona	1990	P.men
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Girona	1990	Q.coc
<i>Rhizopogon luteolus</i>	Pontevedra	1987	P.pin
<i>R. roseolus</i>	Tarragona	1988	P.syl
<i>R. subareolatus</i>	Girona	1989	P.men
<i>R. vulgaris</i>	Pontevedra	1987	P.pin
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Girona	1990	P.men
<i>Tuber maculatum</i>	Girona	1990	P.men

* P.men: *Pseudotsuga menziesii*, P.pin: *Pinus pinaster*, P.syl: *Pinus sylvestris*, Q.coc: *Quercus coccifera*.

Las esporas hidrófobas de *Pisolithus tinctorius* se prepararon para la inoculación mediante su mezcla con vermiculita humedecida con agua. Este método ha resultado ser más efectivo que la incorporación de esporas en agua o arena. La suspensión en agua causa la pérdida de un pigmento que podría ser responsable de la disminución de viabilidad de las esporas (Marx 1976a).

La producción de plantas se realizó en contenedores Spencer Lemaire root-trainers de 175 cc. de capacidad con substrato de turba-vermiculita (1:1, v:v) previamente esterilizado en autoclave (120°C; 1 Kg./cm² de presión) durante una hora. Las semillas se introdujeron por duplicado en cada contenedor. Las plantas se redujeron a una por contenedor tras la germinación.

TABLA 3.2. 1.(d)

Número de esporas producidas por gramo de esporocarpo en distintas especies de hongos ectomicorrícicos utilizados en los ensayos de inoculación con esporas.

ESPECIE DE HONGO	PESO SECO MEDIO / ESPOROCARPO (g)	ESPORAS / g. ESPOROCARPO
<i>Hymenogaster vulgaris</i>	0.20	2.6×10^9
<i>Melanogaster ambiguus</i>	2.17	1.8×10^9
<i>Pisolithus tinctorius</i>	45.50	1.6×10^9
<i>Rhizopogon</i> spp.	0.87	1.0×10^{10}
<i>Scleroderma verrucosum</i>	4.20	1.0×10^9
<i>Tuber maculatum</i>	0.26	7.4×10^7

La inoculación con la suspensión de esporas en agua se realizó un mes tras la germinación para asegurar la presencia de raíces finas. La determinación del tiempo de inoculación se realizó a partir de los resultados obtenidos en la modelización de la producción de raíces cortas de *Pseudotsuga menziesii* en las condiciones de crecimiento del invernadero. La presencia de raíces cortas en el momento de la inoculación puede ser importante por el efecto de las raíces en la estimulación de la germinación de las esporas de algunas especies de hongos (Fries y Birraux 1980).

La dosificación de esporas se realizó dispensando 10 ml. de suspensiones esporales de distinta concentración en cada contenedor para proporcionar 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas por planta.

La aplicación de *Pisolithus tinctorius* se realizó en el momento de la siembra, mezclando la vermiculita conteniendo diferentes dosis de esporas con el sustrato de crecimiento en la proporción 1:10 (v:v, inóculo:sustrato). La preparación de las distintas dosis se realizó mediante la mezcla de esporas

y vermiculita a la dosis máxima y diluyendo a dosis menores mediante la mezcla con la proporción adecuada de vermiculita. En total se prepararon seis mezclas de vermiculita y esporas, de manera que las dosis de esporas por planta en cada tratamiento fueron de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , y 10^8 .

En todos los ensayos se introdujo un tratamiento control (no inoculado) que se utilizó para la comparación de parámetros de crecimiento en los tratamientos en los que todas las dosis probadas fueron efectivas.

En total se prepararon 32 plantas inoculadas con cada una de las dosis de esporas de cada hongo. Las plantas se mantuvieron en un invernadero climatizado en las condiciones ambientales y de manejo descritas en la sección 3.1. durante un período de tiempo entre 14 y 30 semanas. La variación del intervalo de tiempo entre ensayos se debe a la realización de los mismos en distintas épocas del año.

La situación de las plantas en el invernadero fue cambiada periódicamente para evitar posibles efectos microambientales que pudieran interferir en los resultados. Al final del período de crecimiento se tomaron datos de altura, diámetro basal, biomasa aérea y radicular y porcentaje de raíces cortas micorrizadas de 20 plantas tomadas al azar en cada tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de la varianza de una vía. Los datos de porcentajes se normalizaron previamente mediante transformación angular ($\arcsin \sqrt{\text{porcentaje} / 100}$), y se comprobó la distribución normal y homogeneidad de las varianzas del error experimental (Snedecor y Cochran 1980). Las diferencias entre medias se detectaron por el test de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos que no cumplieron las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3.2.1.2. Resultados

De un total de 9 especies probadas, 5 formaron ectomicorrizas en las

condiciones ensayadas (*Hymenogaster vulgaris*, *Melanogaster ambiguus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon subareolatus* y *Tuber maculatum*). Las micorrizas formadas por *Hymenogaster vulgaris* y *Tuber maculatum* con abeto de Douglas no habían sido descritas anteriormente, ya que estas especies no pudieron ser aisladas en cultivo puro. Estas micorrizas se describen posteriormente en esta sección. El resto de micorrizas formadas se describieron anteriormente en la sección 2.3.2. ya que no difieren de las formadas en cultivo puro.

Hymenogaster vulgaris se probó únicamente a tres dosis (10^2 , 10^4 y 10^6 esporas / planta). Las dosis 10^4 y 10^6 esporas / planta resultaron efectivas en la formación de ectomicorrizas. La dosis 10^6 esporas / planta formó un porcentaje máximo de micorrizas del 35% de las raíces cortas. Este porcentaje fue significativamente mayor que el obtenido a la dosis 10^4 esporas / planta (Figura 3.2.1.(f)).

Las micorrizas formadas por *Hymenogaster vulgaris* son de color blanco-amarillento, con elementos lisos, alargados y ligeramente sinuosos. La ramificación es simple o, más raramente, pinnada. La superficie de la micorriza está recubierta por diminutas espículas similares a las de *Tuber*, aunque más cortas. No presenta rizomorfas ni micelio externo.

Los parámetros de crecimiento de las plantas inoculadas con *H. vulgaris* no mostraron diferencias significativas entre dosis, aunque se detectó una tendencia al incremento de la biomasa y del diámetro basal de las plantas al incrementar las dosis y la micorrización (Figura 3.2.1.(f)).

Melanogaster ambiguus formó micorrizas a las dosis iguales o superiores a 10^5 esporas / planta. El porcentaje de micorrizas formado aumentó linealmente al incrementar la dosis a partir de 10^4 esporas planta, con un máximo de micorrización de un 65% de las raíces cortas a la dosis de 10^7 esporas / planta (Figura 3.2.1.(g)). Los porcentajes de micorrización obtenidos a las dosis 10^6 y 10^7 esporas / planta no mostraron diferencias significativas entre ellos, aunque ámbos difirieron de forma significativa con el

porcentaje obtenido a la dosis de 10^5 esporas / planta. La inoculación no incrementó los parámetros de crecimiento de las plantas de forma significativa ni se detectaron tendencias claras excepto en la altura de las plantas que aumentó ligeramente al aumentar la micorrización (Figura 3.2.1.(g)).

Pisolithus tinctorius formó un bajo porcentaje de micorrizas (entre un 5 y un 15% de las raíces cortas infectadas) a las dosis superiores o iguales a 10^5 esporas / planta. Las dosis de esporas que resultaron efectivas no reflejaron diferencias significativas en los porcentajes de micorrizas obtenidos (Figura 3.2.1.(h)). Las plantas inoculadas no mostraron ninguna diferencia significativa entre ellas y con los controles en los parámetros de crecimiento medidos (Figura 3.2.1.(h)).

Rhizopogon subareolatus formó micorrizas a las dosis iguales o superiores a 10^4 esporas / planta. Todas las dosis efectivas formaron micorrizas en un rango del 40-50% de las raíces cortas sin diferencias significativas entre ellas, aunque la dosis de 10^4 esporas / planta formó un porcentaje de micorrizas medio ligeramente inferior al 40% de las raíces cortas (Figura 3.2.1.(i)). Las plantas micorrizadas mostraron un incremento significativo de la altura y biomasa aérea de las plantas a la dosis mayor (10^7 esporas / planta) respecto a las plantas no micorrizadas (Figura 3.2.1.(i)).

La baja producción de esporas de *Tuber maculatum* motivó la realización del ensayo a las dosis de 10^2 , 10^3 y 10^4 esporas / planta. Las tres dosis resultaron efectivas y no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de ectomicorrizas formado, que osciló entre un 45% y un 75% de raíces cortas micorrizadas (Figura 3.2.1.(j)). Las dos dosis superiores (10^3 y 10^4 esporas / planta) formaron un porcentaje de micorrización sensiblemente superior a la dosis menor (10^2 esporas / planta), aunque la variabilidad no permitió establecer diferencias estadísticas.

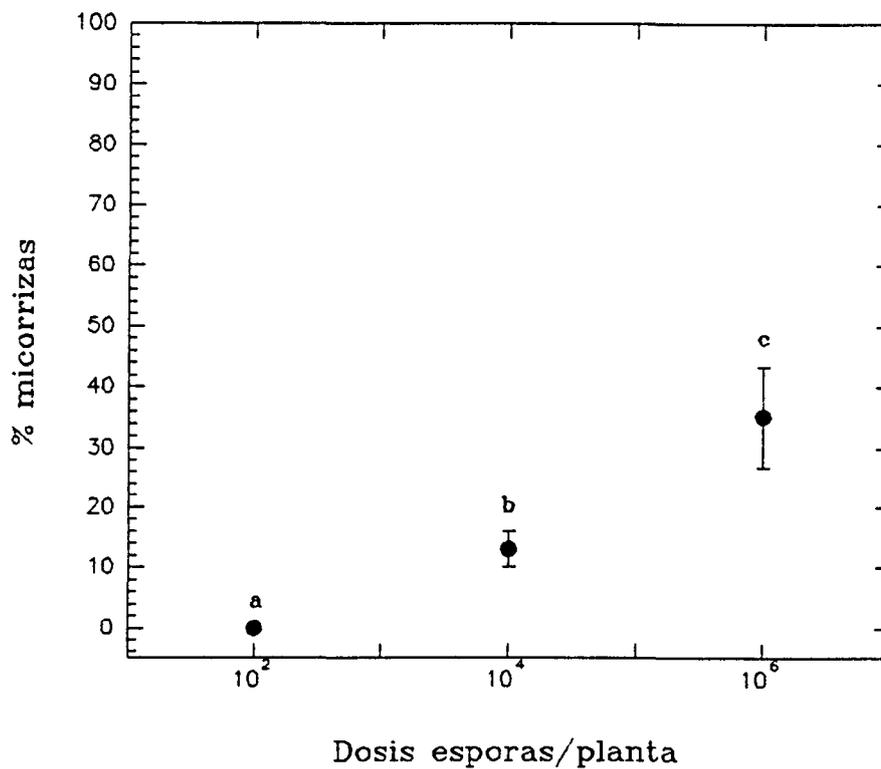
Las micorrizas formadas por *Tuber maculatum* son lisas, de color miel o anaranjadas, con ramificación mayoritariamente pinnada o simple, de tamaño grande y conspicuas. La superficie de la micorriza esta recubierta por

FIGURA 3.2.1.(f)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con esporas de *Hymenogaster vulgaris*.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 26 semanas.

DOSIS ESPORAS/PLANTA	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL (mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
10^6	22.8 a	3.59 a	1.79 a	1.16 a	2.95 a
10^4	23.9 a	3.23 a	1.40 a	1.05 a	2.45 a
10^2	22.0 a	3.23 a	1.32 a	0.96 a	2.28 a
0	22.6 a	3.22 a	1.46 a	0.97 a	2.44 a



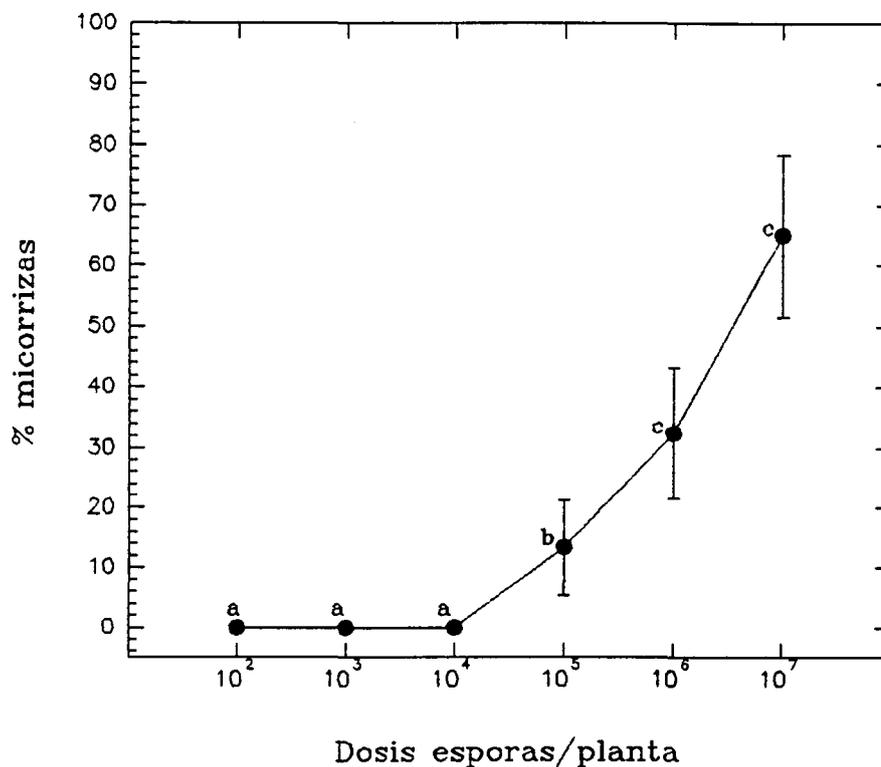
Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(g)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con esporas de *Melanogaster ambiguus*.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 14 semanas.

DOSIS ESPORAS/PLANTA	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL(mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
10^7	21.1 a	2.34 ab	1.10 ab	0.49 a	1.59 ab
10^6	19.9 a	2.80 b	1.30 b	0.81 b	2.11 b
10^5	17.8 a	2.37 ab	1.00 ab	0.56 a	1.56 ab
10^4	17.9 a	2.43 ab	1.00 ab	0.50 a	1.49 a
10^3	16.5 a	2.21 a	0.80 a	0.44 a	1.24 a
10^2	17.3 a	2.27 a	0.89 a	0.44 a	1.33 a
0	17.1 a	2.23 a	0.85 a	0.43 a	1.28 a

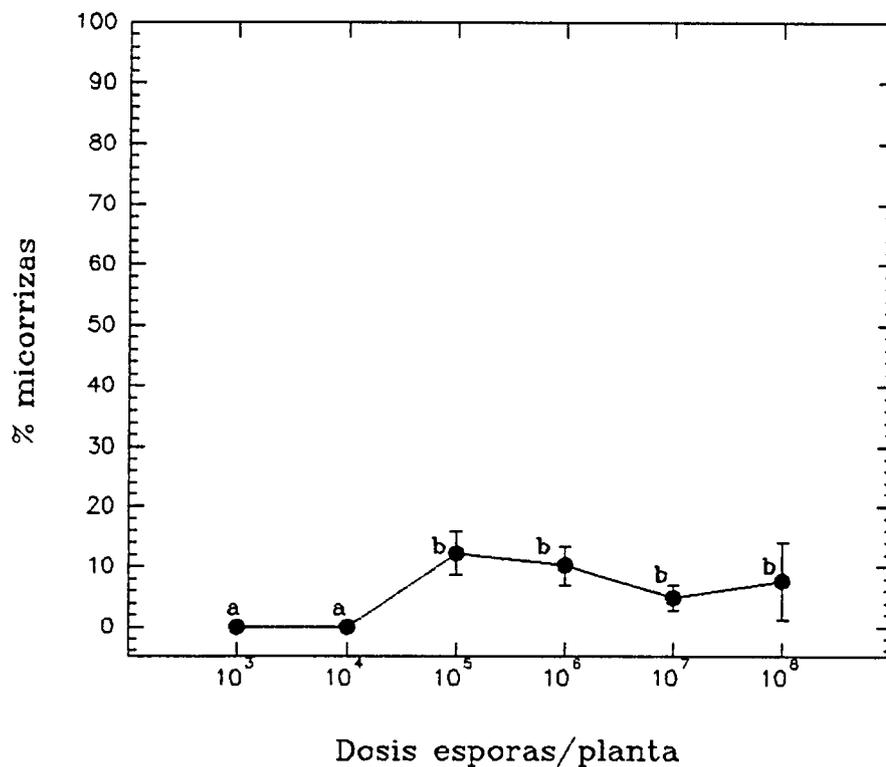


Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(h)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con esporas de *Pisolithus tinctorius*.
Periodo de crecimiento tras inoculación: 22 semanas.

DOSIS ESPORAS/PLANTA	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL (mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
10^8	25.0 a	2.88 a	1.71 a	0.68 a	2.39 a
10^7	26.7 a	3.06 a	1.69 a	0.67 a	2.35 a
10^6	31.0 a	3.40 a	2.32 a	0.87 a	3.19 a
10^5	30.6 a	3.05 a	2.17 a	0.75 a	2.92 a
10^4	28.8 a	3.14 a	1.79 a	0.70 a	2.48 a
10^3	29.9 a	3.27 a	1.96 a	0.85 a	2.81 a
0	27.0 a	3.09 a	1.75 a	0.69 a	2.44 a



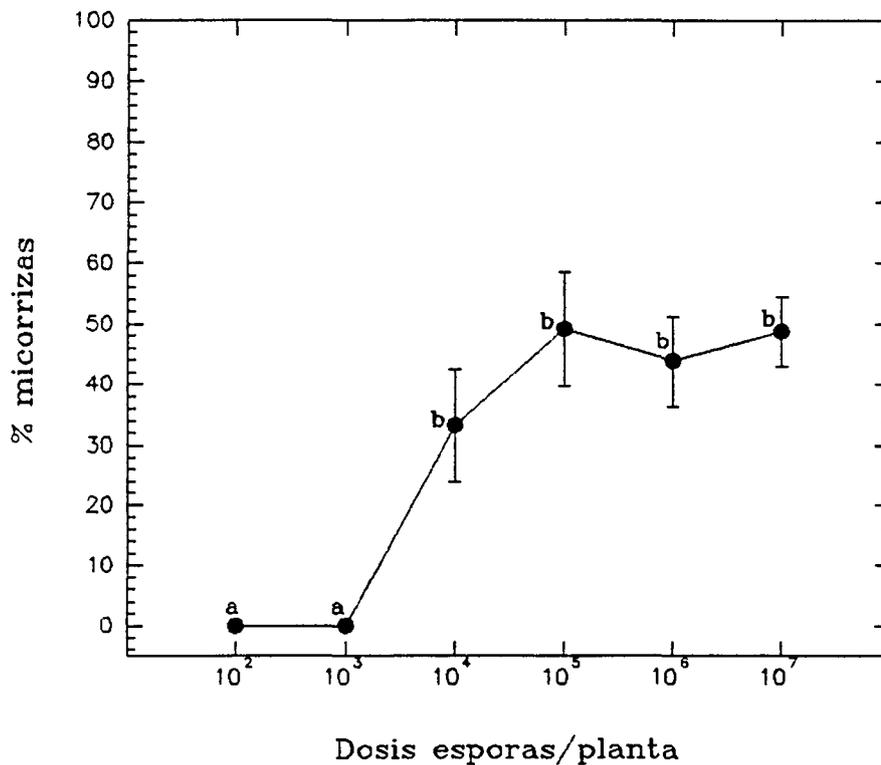
Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(i)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con esporas de *Rhizopogon subareolatus*.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 30 semanas.

DOSIS ESPORAS/PLANTA	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL mm	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
10 ⁷	26.6 c	3.80 a	2.06 b	1.46 b	3.52 b
10 ⁶	20.4 a	3.62 a	1.52 a	1.30 ab	2.82 ab
10 ⁵	27.2 bc	3.64 a	2.08 ab	1.28 ab	3.36 ab
10 ⁴	24.1 abc	3.53 a	1.70 ab	1.20 ab	2.91 ab
10 ³	22.6 abc	3.65 a	1.63 a	1.24 ab	2.87 ab
10 ²	22.7 abc	3.48 a	1.56 a	1.13 a	2.70 a
0	21.5 ab	3.29 a	1.39 a	0.99 a	2.38 a



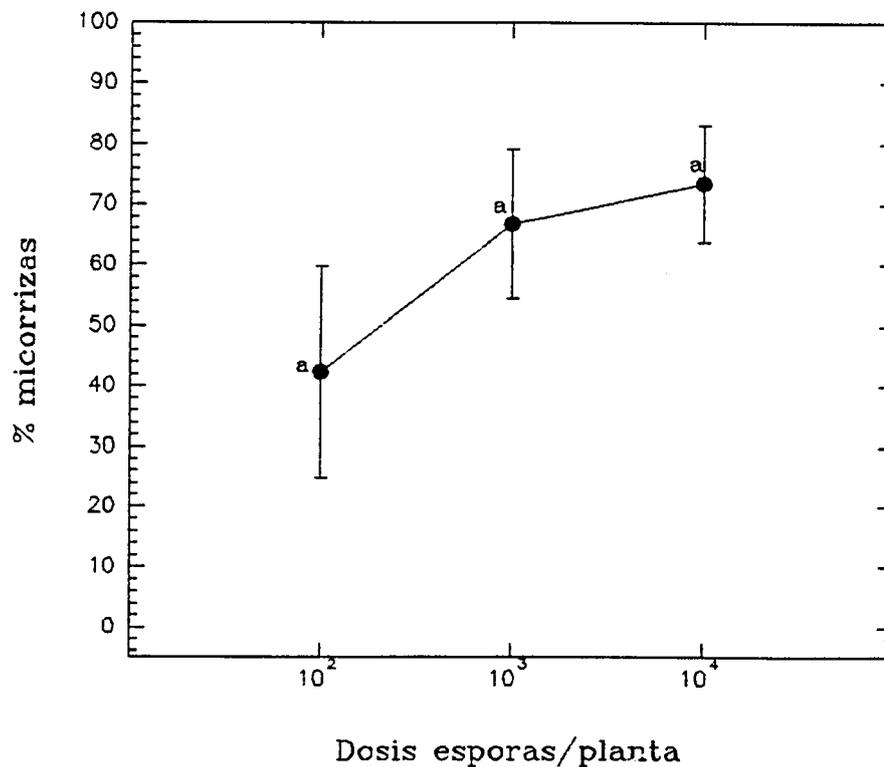
Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P < 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

FIGURA 3.2.1.(j)

Crecimiento y colonización del sistema radicular de plantas de abeto de Douglas inoculadas con esporas de *Tuber maculatum*.

Periodo de crecimiento tras inoculación: 14 semanas.

DOSIS ESPORAS/PLANTA	ALTURA (cm)	DIAMETRO BASAL(mm)	PESO SECO (g)		
			AEREO	RAIZ	TOTAL
10^4	17.3 a	2.35 a	0.99 a	0.55 ab	1.54 ab
10^3	18.1 a	2.39 a	0.89 a	0.54 ab	1.43 ab
10^2	21.4 a	2.67 a	1.39 a	0.76 b	2.15 b
0	16.7 a	2.27 a	0.85 a	0.43 a	1.29 a



Los valores que comparten la misma letra en el gráfico, y dentro de la misma columna en la tabla, no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P < 0.05$). Las barras representan el error estándar interno de la media de 20 plantas.

espículas alargadas características de las micorrizas del género *Tuber*. No se apreciaron rizomorfas ni micelio externo.

Las plantas inoculadas con *Tuber maculatum* mostraron un incremento en todos los parámetros de crecimiento respecto a las plantas control, aunque únicamente las diferencias entre la biomasa radicular y total de los controles no inoculados respecto a las plantas inoculadas a la dosis 10^2 esporas / planta, resultaron estadísticamente significativas (Figura 3.2.1.(j)).

3.2.1.3. Discusión

El incremento de las dosis de esporas suspendidas en agua ha representado un aumento proporcional y significativo del porcentaje de micorrizas únicamente en *H. vulgaris*. La respuesta de *M. ambiguus*, *R. subareolatus* y *Tuber maculatum* ha mostrado una tendencia a la estabilización del porcentaje de micorrización a un valor umbral a partir del cual el incremento de la dosis de esporas no resulta significativamente eficaz.

La dosis óptima de aplicación para establecer el máximo porcentaje de micorrizas con el mínimo número de esporas en las condiciones ensayadas es de 10^6 esporas / planta para *H. vulgaris* y *M. ambiguus*, 10^4 esporas / planta para *R. subareolatus* y 10^2 esporas / planta para *T. maculatum*. El porcentaje de micorrización máximo para todas las especies de hongos inoculadas en forma de esporas suspendidas en agua, se ha situado entre el 40 - 50 % para *H. vulgaris* y *R. subareolatus* y alrededor del 70 % para *M. ambiguus* y *T. maculatum*.

R. subareolatus y *T. maculatum* han formado micorrizas a concentraciones de esporas relativamente bajas. Resultados similares sobre concentraciones de dosis óptimas fueron obtenidos en inoculaciones de abeto de Douglas en contenedor con esporas de *R. vinicolor* y *R. colossus* (Castellano et al. 1985). Las dos especies formaron un elevado porcentaje de micorrizas a dosis iguales o superiores a 10^4 esporas / planta, sin diferencias

significativas entre los porcentajes de raíces cortas infectados al incrementar la dosis de esporas hasta 10^7 esporas / planta. La inoculación con esporas de *Rhizopogon* spp. ha resultado en formación de micorrizas únicamente en *R. subareolatus* que pertenece a una sección taxonómica considerada específica de abeto de Douglas (Molina y Trappe 1982a). El resto de las especies de *Rhizopogon* probadas en este ensayo fueron recolectadas con *Pinus* spp. y muestran una cierta especificidad genérica hacia este género (Trappe 1962a). La capacidad de formación de ectomicorrizas de *T. maculatum* con coníferas ya había sido probada experimentalmente con *Pinus strobus* (Fontana 1967), aunque no se realizó un estudio de dosis.

La aplicación de esporas de *P. tinctorius* incluidas en un sustrato de turba y vermiculita ha resultado eficaz aunque el porcentaje de micorrizas formado ha sido inferior al 15 %. Las dosis efectivas en la formación de micorrizas han sido de 10^5 esporas / planta y superiores sin detectarse diferencias significativas entre ellas. Este tipo de respuesta podría deberse a una distribución poco homogénea de las esporas en la vermiculita.

La aplicación de inóculo de *P. tinctorius* en forma de esporas ha resultado efectiva en la formación de micorrizas en ensayos previos con *Pinus* sp. (Marx 1976a, 1980; Ruehle 1980a), mientras que en *Abies* spp. y *Pseudotsuga menziesii* no ha mostrado efectividad (Alvarez y Trappe 1983a, 1983b). El bajo porcentaje de micorrizas obtenido para este hongo no ofrece garantías sobre el comportamiento de la planta después del trasplante a campo. El umbral a partir del cual se detecta efectividad en la estimulación del crecimiento en campo de plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius*, se ha establecido en un 50 % de las raíces cortas infectadas en *Pinus* sp. (Marx et al. 1991).

Los parámetros de crecimiento de las plantas producidas en las condiciones experimentales, han alcanzado los valores medios considerados como objetivo en la producción comercial de plantas de abeto de Douglas 1+0 en viveros norteamericanos (11.5 cm. de altura y 3 mm. de diámetro)

(Duryea y Landis 1984) tras un período de crecimiento comprendido entre 6 y 7 meses.

La estimulación del crecimiento de las plantas inoculadas en condiciones de contenedor respecto a plantas no inoculadas, no ha sido significativa para ninguno de los hongos estudiados. La aplicación de fertilizante soluble y el crecimiento en un sustrato artificial limitado no ofrece a las micorrizas la posibilidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes ni la superficie de contacto con el suelo, como ocurre cuando las inoculaciones se realizan en planta producida a raíz desnuda. En la mayoría de los ensayos realizados hasta el momento con distintas especies forestales, el efecto de la inoculación en el crecimiento de la planta no ha sido detectado (Landis et al. 1989). Sin embargo, Castellano et al. (1985) indicaron la subestimación de la biomasa fúngica, en forma de micelio externo y rizomorfos producidas en abundancia en géneros como *Rhizopogon*, que se destruye durante el muestreo. Esta biomasa fúngica podría representar un incremento de la biomasa radicular en las plantas inoculadas significativamente mayor que en los controles.

La investigación sobre la metodología de las inoculaciones artificiales en vivero se ha centrado principalmente en la problemática de la producción de inóculo vegetativo (Trappe 1977; Marx 1980), aunque algunas especies de hongos como *P. tinctorius* y *R. vinicolor* han sido utilizadas con éxito en forma de inóculo de esporas para la inoculación de plantas producidas en viveros forestales a raíz desnuda y en contenedor (Marx et al. 1991).

La regularidad y abundancia de la producción de esporocarpos en las parcelas de abeto de Douglas prospectadas (ver sección 2.1) ofrece la posibilidad de obtener inóculo de esporas de *R. subareolatus* y *M. ambiguus* en número suficiente para la inoculación rutinaria de viveros forestales. En base a los datos de dosis efectivas y producción de esporas por esporocarpo (Tabla 3.2.1.(c)), se puede especular que con un solo esporocarpo de *R. subareolatus* se podrían inocular aproximadamente un

millón de plantas producidas en contenedor. En el caso de *M. ambiguus*, el número de plantas factibles de ser inoculadas a la dosis óptima se reduce a 4000 por esporocarpo.

La economía y facilidad de aplicación a nivel comercial mediante irrigación son los principales argumentos a favor de este tipo de inóculo. La investigación futura en el campo de las inoculaciones con esporas debe incluir estudios del comportamiento en campo de plantas inoculadas, así como la determinación de los valores umbrales de micorrización requeridos para cada especie de hongo.

3.3 INOCULACIONES MIXTAS

La capacidad de los hongos ectomicorrícicos introducidos artificialmente para competir con éxito con otros microorganismos de la rizosfera, es uno de los factores considerados en la selección de hongos para su uso en prácticas de inoculación en viveros (Trappe 1977). Los microorganismos de la rizosfera pueden interaccionar de forma positiva o negativa con los hongos ectomicorrícicos, estimulando o inhibiendo respectivamente su efecto sobre la planta hospedadora (Ridge y Theodorou 1972; Bowen y Theodorou 1979; Garbaye y Bowen 1987).

La competitividad de un hongo ectomicorrícico, definida por Garbaye (1983) como su capacidad de crecer y formar asociaciones micorrícicas bajo condiciones ecológicas impuestas, depende de las especies simbiotes consideradas (Garbaye 1984). La inoculación con dosis de inóculo elevadas puede permitir al hongo la colonización de las raíces cortas de la planta hospedadora, incluso en condiciones de crecimiento en suelos naturales con una elevada presión competitiva. Garbaye (1983) demostró que el tipo de suelo y la intensidad de inoculación eran factores que influían en la tasa de colonización de *Hebeloma crustuliniforme* sobre raíces de *Fagus sylvatica*.

Las relaciones de colonización y competencia entre hongos ectomicorrícicos, introducidos y nativos, fueron estudiadas por Fleming (1985) y McAfee y Fortin (1986) en condiciones de campo, y por Grogan y Mitchell (1990) en suelos de vivero, encontrando en ámbos casos que la naturaleza de los hongos y plantas huésped implicados, así como las condiciones ambientales eran los factores que determinaban la persistencia de una determinada especie fúngica formando micorrizas.

El establecimiento de varias especies de hongos ectomicorrícicos en el mismo sistema radicular es un fenómeno común en la naturaleza (Zak y Marx 1964; Laiho 1970; Benecke y Göbl 1974; Trappe 1977). Se ha

demostrado que las proporciones de varios tipos de micorrizas varían después de una alteración del suelo (Schoeneberger y Perry 1982; Perry y Rose 1983; Pilz y Perry 1984), probablemente debido a diferencias en la respuesta fúngica a los cambios ambientales.

Sinclair (1974) observó que las plantas de abeto de Douglas producidas a raíz desnuda crecían mejor con dos hongos formando ectomicorrizas que con uno solo. Chu-Chou y Grace (1985) inocularon plantas de *Pinus radiata* con tres hongos simultáneamente, obteniendo plantas que mostraban características intermedias a las que presentaban las plantas inoculadas con cada uno de los tres hongos. Una respuesta similar fue encontrada por Daft (1983) en inoculaciones con cuatro especies del hongo vesículo-arbuscular *Glomus* spp. Estos resultados indican que las inoculaciones múltiples podrían ser más efectivas en la producción de plántulas de calidad (medida en parámetros fisiológicos más que morfológicos) capaces de tolerar un rango de condiciones ecológicas más amplio que las plantas inoculadas con una sola especie de hongo ectomicorrízico.

La producción de plantas inoculadas con diversas especies de hongos ectomicorrízicos requiere estudios previos sobre la capacidad colonizadora relativa de los hongos implicados bajo distintas dosis de inoculación. Estos estudios pueden permitir la definición de las condiciones de inoculación necesarias para el establecimiento de dos especies simultáneamente en el mismo sistema radicular. De igual modo, pueden obtenerse datos sobre relaciones de competencia entre hongos ectomicorrízicos y sobre el efecto parcial de cada hongo en el desarrollo de la planta.

En la primera parte de esta sección, se presentan los estudios preliminares *in vitro* sobre combinaciones dobles de hongos ectomicorrízicos, aplicados en diferentes proporciones relativas sobre plántulas de abeto de Douglas. La segunda parte muestra la aplicación experimental de las inoculaciones dobles de abeto de Douglas producido en

contenedor con distintos hongos seleccionados.

3.3.1. INOCULACIONES DOBLES EN CULTIVO PURO

El objetivo de este trabajo es el estudio, en condiciones controladas *in vitro*, del efecto de la inoculación de abeto de Douglas con dos especies distintas de hongos ectomicorrícicos aplicadas simultáneamente. La variación de las proporciones de cada simbionte permitirá determinar la capacidad de micorrización relativa de cada hongo y su efecto en la formación de raíces cortas y producción de biomasa.

Este estudio con un modelo de dos hongos introducidos junto con una misma planta hospedadora, se considera una primera aproximación al desarrollo de métodos para producir plántulas de abeto de Douglas inoculadas en contenedor con más de una especie de hongo ectomicorrícico, con el objetivo de incrementar la diversidad de simbiontes fúngicos en un mismo sistema radicular y mejorar la adaptabilidad al trasplante de la planta de reforestación.

3.3.1.1. Material y métodos

Se esterilizaron superficialmente semillas de abeto de Douglas con H₂O₂ 30% y se introdujeron para su germinación en viales de vidrio conteniendo agar malta (2%) para la detección de posibles contaminantes. Cuando las plántulas formaron una radícula de unos 2 cm. de longitud, se transfirieron al interior de tubos de síntesis esterilizados que contenían una mezcla de turba-vermiculita (1:10, v:v) humedecida con medio líquido MMN según la técnica descrita por Molina y Palmer (1982). La selección de hongos se realizó en base a estudios previos según su capacidad de formar ectomicorrizas con el abeto Douglas en cultivo puro (Tabla 2.3.(a)) y por características morfológicas distintivas de las micorrizas para facilitar su

reconocimiento.

Las cepas de hongos ectomicorrícicos utilizadas en este ensayo fueron: *Pisolithus tinctorius* A-93, *Rhizopogon subareolatus* A-116, *R. roseolus* A-96 y *Laccaria bicolor* S-238. Los ejemplares de herbario correspondientes a cada cepa (excepto *Laccaria bicolor* S-238) se encuentran depositados en el herbario del Centro de Cabrils del IRTA (Ctra. de Cabrils s/n, Cabrils, Barcelona). Los datos de aislamiento y recolección se presentan en la Tabla 3.2.1.(a).

Los aislamientos se cultivaron separadamente en placas de Petri conteniendo medio agarificado MMN modificado con 5 g./l. de glucosa. Tras 25 días en incubación a 25°C, se trituraron las colonias durante 15 segundos a baja velocidad en un homogeneizador Waring-blendor previamente autoclavado conteniendo agua destilada. A partir de los homogeneizados de micelio, se ajustaron las densidades de inóculo a un mismo valor añadiendo agua destilada.

Los tubos de síntesis conteniendo plántulas de un mes se inocularon con una suspensión de micelio añadida desde la parte superior del tubo y conteniendo una combinación de dos hongos ectomicorrícicos. Las combinaciones probadas fueron: *Pisolithus tinctorius* + *Rhizopogon subareolatus*, *P. tinctorius* + *R. roseolus*, *Laccaria bicolor* + *R. subareolatus* y *L. bicolor* + *P. tinctorius*. Se aplicó un total de 12 ml. de suspensión de micelio por planta en las proporciones: 12:0, 9:3, 6:6, 3:9 y 0:12 (v:v, Hongo A:Hongo B).

Tras la inoculación, los tubos se mantuvieron durante tres meses en un aparato de síntesis bajo condiciones experimentales iguales a las descritas en la sección 2.3. (sustrato a 20-25° de temperatura y 16 horas de fotoperíodo con 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ de intensidad lumínica obtenida mediante fluorescentes "Cool white"). Se prepararon cinco replicados para cada proporción en cada combinación doble con lo que el número de tubos preparados fue de 90 para el experimento completo.

Al final del período de crecimiento, se extrajeron cuidadosamente las plantas de los tubos añadiendo agua corriente. El sistema radicular se examinó bajo el estereomicroscopio para contar el número total de raíces cortas y de micorrizas formadas por cada especie de hongo. Las diferencias de color y aspecto entre los dos hongos de cada combinación permitió la distinción de las micorrizas formadas por cada especie (ver descripción morfológica en la sección 2.3.).

El desarrollo de las plantas inoculadas y no inoculadas se determinó mediante la medición del peso seco de la planta completa tras 48 horas en una estufa de desecación a 80°C.

Los datos sobre la formación de raíces cortas y número total de ectomicorrizas formadas por cada especie se representaron gráficamente. Los resultados de producción de biomasa se analizaron mediante análisis de la varianza de una vía, previa comprobación de la distribución normal y la homogeneidad de las varianzas del error experimental (Snedecor y Cochran 1980). Las diferencias entre medias se detectaron mediante el test de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.3.1.2 Resultados

Las plantas inoculadas con la combinación *P. tinctorius* (Pt) + *R. subareolatus* (Rs) (Figura 3.3.1.(a)(A)) formaron un número similar de raíces cortas independientemente de la proporción de ámbos inoculantes. *R. subareolatus* formó micorrizas en todas las proporciones dobles, mientras que *P. tinctorius* únicamente formó micorrizas en la proporción Pt9:Rs3. En esta proporción, las dos especies formaron ectomicorrizas simultáneamente en el mismo sistema radicular, con porcentajes del 45 y del 20 % para *R. subareolatus* y *P. tinctorius* respectivamente. La presencia de dos hongos formando micorrizas en el mismo sistema radicular, no implicó un aumento en el número total de micorrizas por planta.

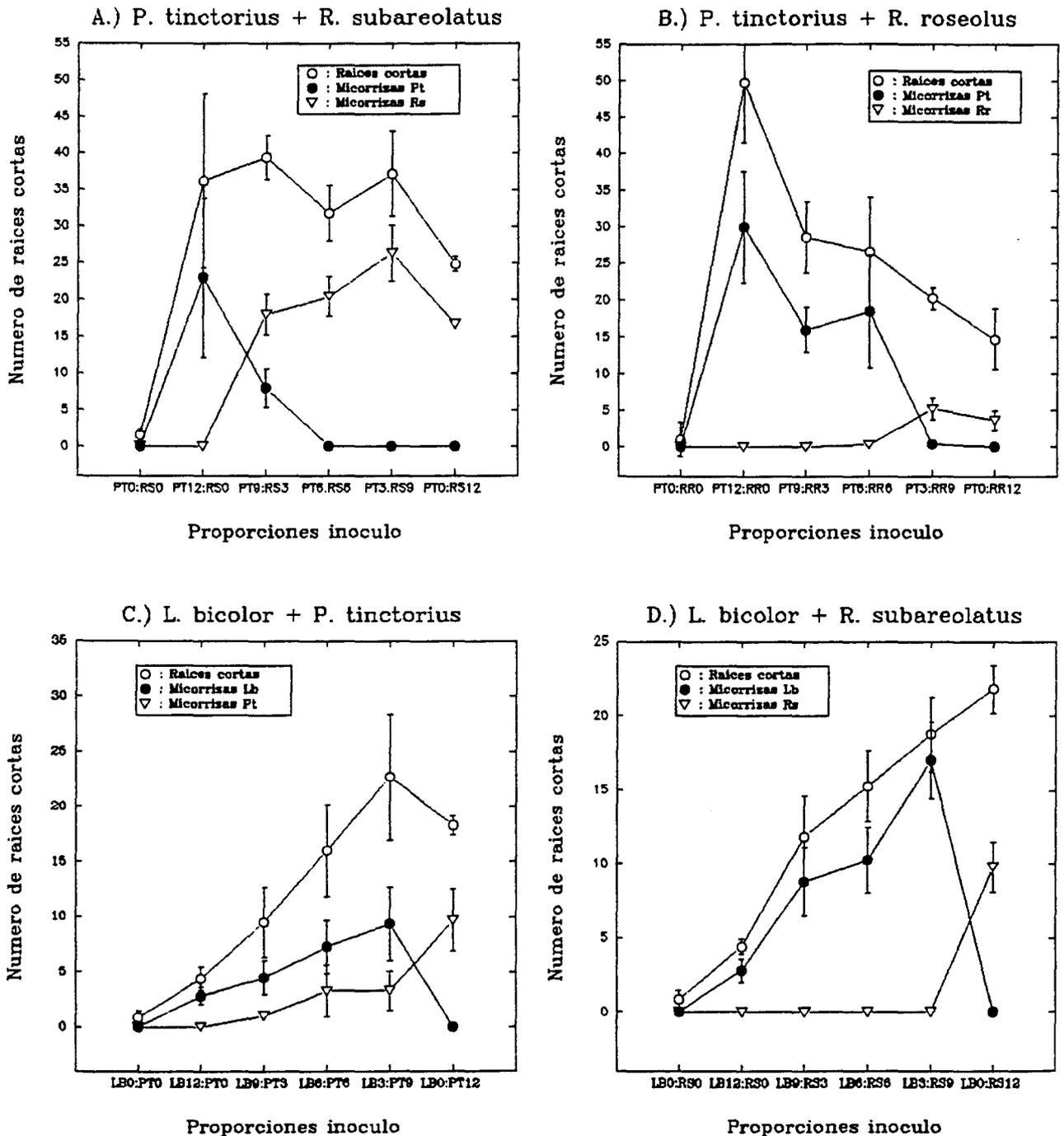
La inoculación con la combinación *P. tinctorius* + *R. roseolus* (Rr) (Figura 3.3.1.(a)(B)) dió como resultado una disminución del número total de raíces cortas a medida que se incrementaba la proporción de *R. roseolus* y, simultáneamente, se reducía la de *P. tinctorius*. *P. tinctorius* formó micorrizas cuando se aplicó a una dosis igual o superior a la de *R. roseolus*. La combinación Pt3:Rr9 dió como resultado una ausencia casi completa de micorrizas de *P. tinctorius* y la presencia de micorrizas de *R. roseolus* en un porcentaje bajo. Esta última especie únicamente formó micorrizas en la proporción Pt3:Rr9 y en ausencia de *P. tinctorius*, con unos porcentajes de micorrización inferiores al 30 %.

Las plantas inoculadas con la combinación *L. bicolor* (Lb) + *P. tinctorius* (Figura 3.3.1.(a)(C)) mostraron un incremento en la producción de raíces cortas relacionado directamente con el aumento de la proporción de *P. tinctorius* y, consecuentemente, con la disminución de la proporción de *L. bicolor* en las combinaciones dobles. Un incremento en la proporción de *P. tinctorius* también se reflejó en la estimulación de la formación de ectomicorrizas de los dos hongos, especialmente de *L. bicolor* a pesar de la disminución de inóculo de esta especie. En todas las combinaciones dobles se apreció la coexistencia de los dos tipos de micorrizas en el mismo sistema radicular, aunque en una proporción muy baja para *P. tinctorius*.

Las plantas inoculadas con la combinación *L. bicolor* + *R. subareolatus* (Figura 3.3.1.(a)(D)) mostraron el mismo efecto que la combinación anterior, con un incremento en la producción total de raíces cortas al incrementar la proporción de *R. subareolatus* sobre *L. bicolor*. De igual modo, se encontró una relación directa entre el número total de raíces cortas formadas y el número de micorrizas formadas por *L. bicolor*. *R. subareolatus* llegó a colonizar el sustrato parcialmente y a formar micorrizas en ausencia de *L. bicolor* pero no formó micorrizas bajo las condiciones experimentales ensayadas en ninguna de las proporciones dobles.

FIGURA 3.3.1.(a)

Número total de raíces cortas y micorrizas formadas en abeto de Douglas producido asépticamente en un sustrato de turba y vermiculita, e inoculado con 12 ml. de suspensión micelial compuesta por combinaciones dobles de hongos ectomicorrícicos aplicados a distintas dosis relativas. Las barras representan el error estándar interno de la media de 5 plantas.



Todas las plantas no inoculadas mostraron sistemas radiculares muy poco desarrollados con un número de raíces finas muy bajo o nulo en algunas plantas.

El efecto en la producción de biomasa por la planta fue significativamente mayor en las plantas inoculadas que en las no inoculadas (Tabla 3.3.1.(a)).

TABLA 3.3.1.(a)

Peso seco relativo de plantas de abeto de Douglas producidas axénicamente *in vitro* e inoculadas con 12 ml. de suspensión miceliar compuesta por diferentes combinaciones duales de cuatro hongos ectomicorrícicos inoculados en diferentes proporciones. Los valores son referidos al control (0:0)

Pt: *Pisolithus tinctorius* A-93 Rs: *Rhizopogon subareolatus* A-116
Rr: *R. roseolus* A-96 Lb: *Laccaria bicolor* S-238

PROPORCIONES INOCULO (ml.)	COMBIN.		DOBLE	
	Pt : Rs	Pt : Rr	Lb : Rs	Lb : Pt
0:0	1.0 a	1.0 a	1.0 a	1.0 a
12:0	3.9 b	4.6 d	2.0 b	2.0 b
9:3	4.1 b	4.2 cd	2.6 bc	2.9 c
6:6	3.9 b	4.4 cd	3.4 cd	3.0 c
3:9	4.1 b	3.6 bc	3.2 cd	2.6 c
0:12	3.9 b	3.0 b	3.6 d	2.6 c

Los valores que comparten la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente distintos por el test de Tukey ($P \leq 0.05$).

El efecto en el crecimiento estuvo directamente relacionado con la producción total de raíces cortas en cada combinación doble, siendo significativamente mayor a concentraciones crecientes de *P. tinctorius* o *R. subareolatus*. Estas especies también estimularon la formación de raíces cortas en mayor grado que *R. roseolus* o *L. bicolor*.

3.3.1.3. Discusión

La producción total de raíces cortas en todas las combinaciones probadas estuvo directamente relacionada con la presencia de hongos ectomicorrícicos en el sustrato de crecimiento. Este efecto es debido probablemente a la producción de compuestos reguladores del crecimiento de naturaleza hormonal por algunos hongos ectomicorrícicos, que estimulan la producción de raíces (Marx et al. 1970; Slankis 1973; Graham y Linderman 1980). Las condiciones experimentales de crecimiento en tubos cerrados probablemente contribuyeron a incrementar este efecto que podría ser desempeñado por diferentes microorganismos en suelos naturales.

R. subareolatus y *P. tinctorius* fueron las especies más efectivas en la inducción de la formación de raíces finas en abeto de Douglas. *R. subareolatus* (un hongo específico de abeto de Douglas) se comportó como un colonizador radicular agresivo que desplazó a *P. tinctorius* (un hongo no específico), incluso cuando se inoculó en pequeñas dosis.

De acuerdo con los resultados obtenidos por McAfee y Fortin (1986), *P. tinctorius* es un buen colonizador radicular pero un mal competidor en suelos naturales, mientras que *R. rubescens* es un buen competidor en suelos de pinares. Nuestros resultados indican que *P. tinctorius* desplaza a *R. roseolus* (un hongo específico de *Pinus* spp.) el cual probablemente solo forma micorrizas con abeto de Douglas en condiciones axénicas aunque no es efectivo en la estimulación de la producción de raíces cortas en esta especie hospedadora.

L. bicolor (un hongo no específico) desplazó a *P. tinctorius* y *R. subareolatus* aunque la formación de micorrizas estuvo condicionada por la presencia de otro simbiote inductor de la formación de raíces cortas como *P. tinctorius* y *R. subareolatus*. Este papel inductor podría ser desempeñado por otros microorganismos del suelo, lo cual podría ser uno de los factores que explicarían el éxito del mismo aislamiento de *L. bicolor* en la estimulación del crecimiento de abeto de Douglas en condiciones de vivero a raíz desnuda que ha sido descrito por Le Tacon et al. (1988). *L. bicolor* ha resultado ser un buen competidor en suelos donde está normalmente asociado con bacterias (McAfee y Fortin 1986; Grogan y Mitchell 1990). El efecto de determinadas bacterias del suelo en la estimulación de la formación de ectomicorrizas de *L. bicolor* en abeto de Douglas ha sido descrito por Garbaye et al. (1990) y Duponnois y Garbaye (1991).

Los efectos en la producción de biomasa estuvieron significativamente relacionados con la presencia de hongos inductores de la producción de raíces cortas (Graham y Linderman 1980). El escaso desarrollo de las plántulas control no inoculadas indica la dependencia del abeto de Douglas de la presencia de microorganismos rizosféricos entre los que se incluyen los hongos ectomicorrícicos (Garbaye et al. 1990; Duponnois y Garbaye 1991).

De acuerdo con resultados obtenidos, la selección de hongos ectomicorrícicos para ser combinados en inoculaciones múltiples debería considerar en primer lugar la capacidad relativa de colonización radicular por parte de cada hongo, y en segundo lugar la capacidad de inducir la formación de raíces cortas en la planta hospedadora. El primer punto será de utilidad en la selección de combinaciones compatibles en el mismo sistema radicular y la proporción adecuada de inóculo. El segundo punto puede ser de especial interés en viveros de producción en contenedor con sustratos artificiales desinfectados, donde la producción de raíces cortas puede depender, además de los factores genéticos, nutricionales y ambientales, de los hongos micorrícicos introducidos artificialmente.

3.3.2. INOCULACIONES DOBLES EN CONTENEDOR

Las inoculaciones mixtas con hongos ectomicorrícicos en viveros no han sido desarrolladas experimentalmente, a pesar de que se ha reconocido el interés de su realización (Trappe 1977).

Chu-Chou y Grace (1985) utilizaron inóculo mixto de esporas obtenido a partir de esporocarpos de *Laccaria laccata*, *Rhizopogon luteolus* y *R. rubescens*. El efecto de este inóculo en la estimulación del crecimiento y absorción de nutrientes de *Pinus radiata* fue comparado con el efecto de cada hongo por separado. Igualmente se examinó la colonización relativa de cada hongo. Los resultados obtenidos indicaron que el inóculo mixto provocó un efecto en el crecimiento y captación de nutrientes intermedio entre los efectos producidos por cada hongo por separado. La colonización inicial del sistema radicular por el inóculo mixto, expresada en el porcentaje de micorrizas formado, mostró una dominancia de *R. luteolus* a los 6 meses y un equilibrio entre los tres hongos a los 9 y 11 meses.

La importancia de combinar hongos seleccionados con diferentes estrategias para la inoculación de plantas, fue también puesta de manifiesto por Daft (1983) para hongos endomicorrícicos. Las plantas inoculadas con inóculo mixto mostraron un crecimiento intermedio al producido por cada hongo por separado.

La expresión del efecto de varios hongos seleccionados en una misma planta es de gran interés en la mejora de la adaptabilidad de las plantas forestales producidas en vivero. Las investigaciones sobre las funciones de los hongos ectomicorrícicos han permitido seleccionar hongos capaces de estimular el crecimiento de diferentes especies arbóreas en plantación como *Laccaria bicolor* (Le Tacon et al. 1988) y *Pisolithus tinctorius* (Marx 1977b; Marx et al. 1977a; Berry y Marx 1978; Marx y Artman 1979; Ruehle et al. 1981; Marx et al. 1988; Garbaye et al. 1988). Algunos géneros como *Rhizopogon* están asociados a una mayor tolerancia de la planta a la

sequía como ha sido demostrado para *Rhizopogon luteolus* (Theodorou y Bowen 1970) y *R. vinicolor* (Parke et al. 1983). *R. vinicolor* también ha inhibido el crecimiento de algunos patógenos *in vitro* (Zak 1971). La importancia de la combinación de los efectos de varios hongos ectomicorrícicos en una misma planta es obvia, por lo que el estudio de las técnicas de inoculación con varias especies de hongos ectomicorrícicos merece un considerable esfuerzo investigador.

En esta sección se ha realizado un estudio sobre la capacidad de colonización relativa de dos hongos ectomicorrícicos aplicados simultáneamente en plantas de abeto de Douglas producidas en contenedor. El principal objetivo de este trabajo es la determinación de la combinación óptima de aplicación de inóculo para obtener plantas con dos simbiontes seleccionados coexistiendo en un mismo sistema radicular en condiciones de contenedor.

3.3.2.1. Material y Métodos

La selección de hongos y del método de inoculación para su utilización en combinaciones dobles se realizaron en función de los resultados obtenidos en los ensayos de inoculaciones en contenedor y en las combinaciones dobles *in vitro*.

Se utilizaron dos combinaciones dobles de hongos ectomicorrícicos: *Laccaria bicolor* S-238 + *Rhizopogon subareolatus* (aplicados en forma de micelio en turba : vermiculita y esporas respectivamente) y *Melanogaster ambiguus* + *R. subareolatus* (aplicados ámbos en forma de esporas). En cada combinación se varió la proporción de *L. bicolor* y *M. ambiguus* respectivamente y se mantuvo fija la dosis de *R. subareolatus*. De este modo, se eligieron dosis variables y efectivas de dos especies de hongos para graduar la presión competitiva sobre *R. subareolatus*.

De las cuatro combinaciones dobles de hongos ectomicorrícicos

probadas en síntesis en cultivo puro, únicamente se probó en contenedor la combinación *Laccaria bicolor* S-238 + *Rhizopogon subareolatus*. El resto de combinaciones incluían a *Pisolithus tinctorius* que no resultó efectivo en los ensayos en contenedor en forma de inóculo vegetativo.

Se utilizaron semillas de abeto de Douglas procedentes de Oregon (origen 261, lote n° 313-1980) desinfectadas superficialmente con H₂O₂ durante 30 minutos y estratificadas a 5°C durante 35 días. La siembra se realizó en contenedores root trainers Spencer-Lemaire de 175 cc. de capacidad, conteniendo una mezcla esterilizada de turba:vermiculita (1:1, v:v).

La inoculación de *L. bicolor* se realizó en el momento de la siembra en la primera combinación y se utilizaron tres dosis: 1:8, 1:16 y 1:32 (v:v, inóculo: sustrato). Estos tres tratamientos se combinaron con una única dosis de esporas de *R. subareolatus* (10⁶ esporas / planta) que se aplicaron un mes después de la germinación de las semillas.

En la segunda combinación de hongos, se aplicaron las esporas un mes después de la siembra y de manera simultánea en plantas preparadas de igual forma que en la combinación anterior. En esta combinación se mantuvo igualmente fija la dosis de *R. subareolatus* a 10⁶ esporas / planta y se varió la dosis de *M. ambiguus* a 10⁵, 10⁶ y 10⁷ esporas / planta.

Se prepararon un total de 64 plantas por cada tratamiento dentro de cada combinación (64 x 3 x 2 = 394 plantas) que se mantuvieron durante 5 meses en condiciones controladas dentro de un invernadero en las condiciones ambientales y de manejo establecidas en la sección 3.1. La uniformidad de condiciones ambientales entre tratamientos se mantuvo por intercambios periódicos de la posición de las plantas dentro del invernadero.

Al final del período de crecimiento, se examinaron los sistemas radiculares de todas las plantas y se determinó el número de plantas infectadas por cada uno de los hongos introducidos en cada combinación y el porcentaje de micorrizas formado por cada hongo en las plantas con infecciones simultáneas. Para cada combinación, las diferencias entre

frecuencias de plantas infectadas con uno ó dos hongos en cada tratamiento se analizaron mediante tablas de contingencia, con un nivel de significación ≤ 0.05 .

3.3.2.2. Resultados

La inoculación de plantas con la combinación doble: *Laccaria bicolor* S-238 + *Rhizopogon subareolatus* proporcionó plantas micorrizadas con una sólo o con dos especies de hongos simultáneamente en los tres tratamientos probados (Figura 3.3.2 (a)).

La disminución progresiva de la dosis de *L. bicolor* desde 1:8 hasta 1:32 (v:v) provocó un incremento significativo del número de plantas micorrizadas con esta especie desde el 23% del total de plantas infectadas en la combinación *L. bicolor* 1:8 + *R. subareolatus*, hasta un 87% de las plantas infectadas de forma monoespecífica por *L. bicolor* en la combinación *L. bicolor* 1:32 + *R. subareolatus*. Este incremento de plantas infectadas exclusivamente con *L. bicolor* contrasta con el número de plantas infectadas con *R. subareolatus* que descendió significativamente desde un 32% de plantas infectadas exclusivamente con este hongo cuando se combinó con la dosis 1:8 de *L. bicolor*, hasta ninguna planta infectada con este hongo cuando *L. bicolor* se aplicó a la dosis 1:32.

El porcentaje de plantas con dos hongos formando micorrizas simultáneamente en el sistema radicular, se mantuvo entre un 41 y un 45% del total de plantas infectadas cuando *L. bicolor* se aplicó a las dosis 1:8 ó 1:16, y descendió al 11% a la dosis 1:32.

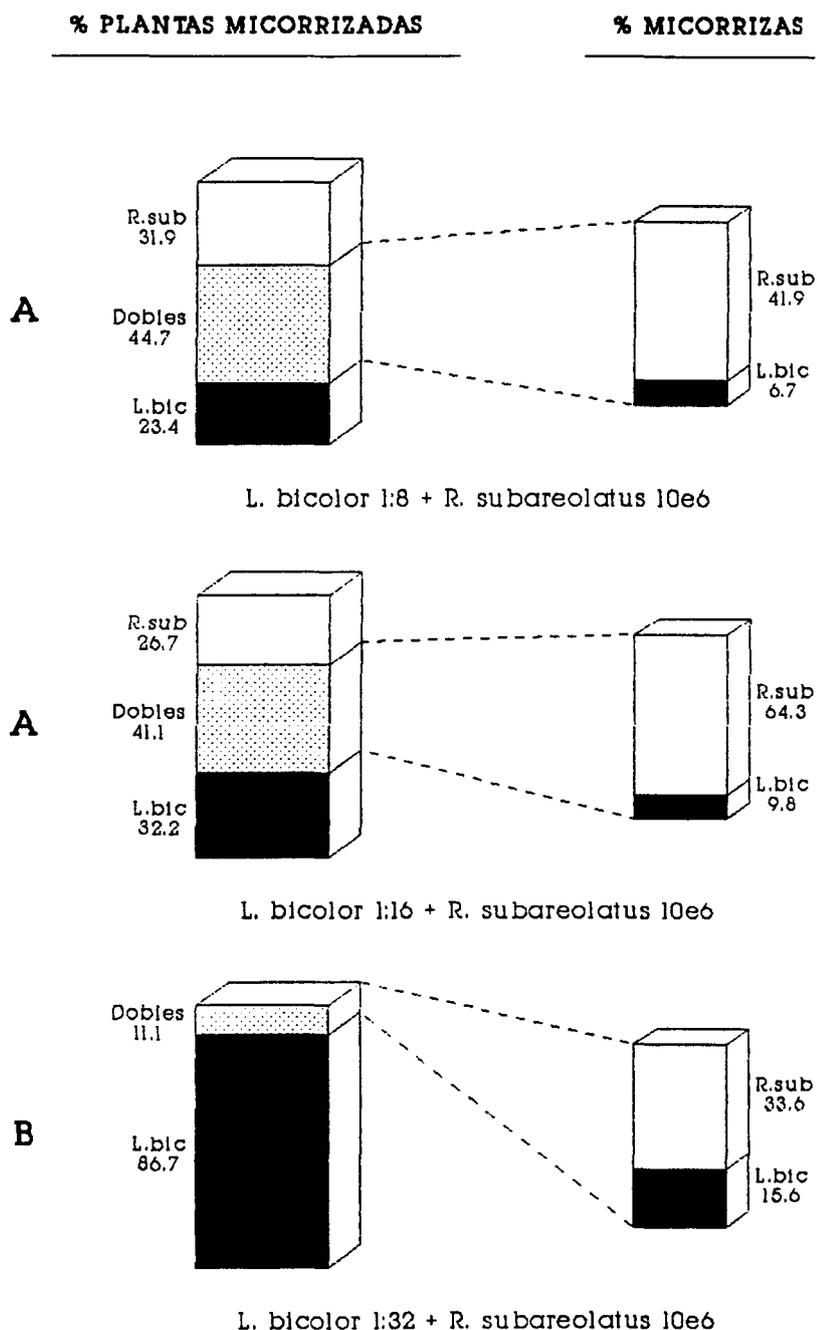
Todas las plantas con infecciones dobles mostraron un porcentaje de micorrizas mayor para *R. subareolatus* que para *L. bicolor* (Figura 3.3.2.(a))., aumentando progresivamente el porcentaje de micorrizas formado por *L. bicolor* desde un 7% a la dosis 1:8 hasta un 16% a la dosis 1:32.

Las plantas inoculadas con la combinación *M. ambiguus* + *R.*

FIGURA 3.3.2.(a)

Porcentaje de plantas de abeto de Douglas con micorrizas monoespecíficas y dobles tras la inoculación mixta con *Rhizopogon subareolatus* (10^6 esporas/planta) + *Laccaria bicolor* S-238 aplicada a 3 dosis de inóculo vegetativo (1:8, 1:16 y 1:32 v:v, inóculo:substrato).

Las frecuencias obtenidas entre tratamientos se compararon mediante tablas de contingencia. Los tratamientos que comparten la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).



subareolatus se infectaron únicamente con *R. subareolatus* cuando *M. ambiguus* se aplicó a la dosis de 10^5 esporas / planta (Figura 3.3.2.(b)). El incremento de la dosis de *M. ambiguus* a 10^6 y 10^7 esporas / planta, disminuyó en forma significativa el porcentaje de plantas infectadas únicamente con *R. subareolatus* que fue del 71 y 23% respectivamente. Simultáneamente, estas dosis fueron efectivas en la producción de plantas infectadas únicamente con *M. ambiguus* que constituyeron un 19% y un 42% de las plantas infectadas respectivamente.

Las plantas con infecciones dobles constituyeron un 10% de las plantas micorrizadas en la combinación *M. ambiguus* 10^6 + *R. subareolatus* 10^6 esporas / planta. Este porcentaje aumentó significativamente al 35% en la combinación *M. ambiguus* 10^7 + *R. subareolatus* 10^6 esporas / planta. Las plantas con infecciones dobles mostraron un predominio de las micorrizas de *M. ambiguus* sobre las de *R. subareolatus* cuando la primera especie se aplicó a la dosis de 10^6 esporas / planta. La dosis de 10^7 esporas / planta de *M. ambiguus* provocó un porcentaje de micorrización similar de entre el 30 y 40% de raíces cortas infectadas por cada especie de hongo.

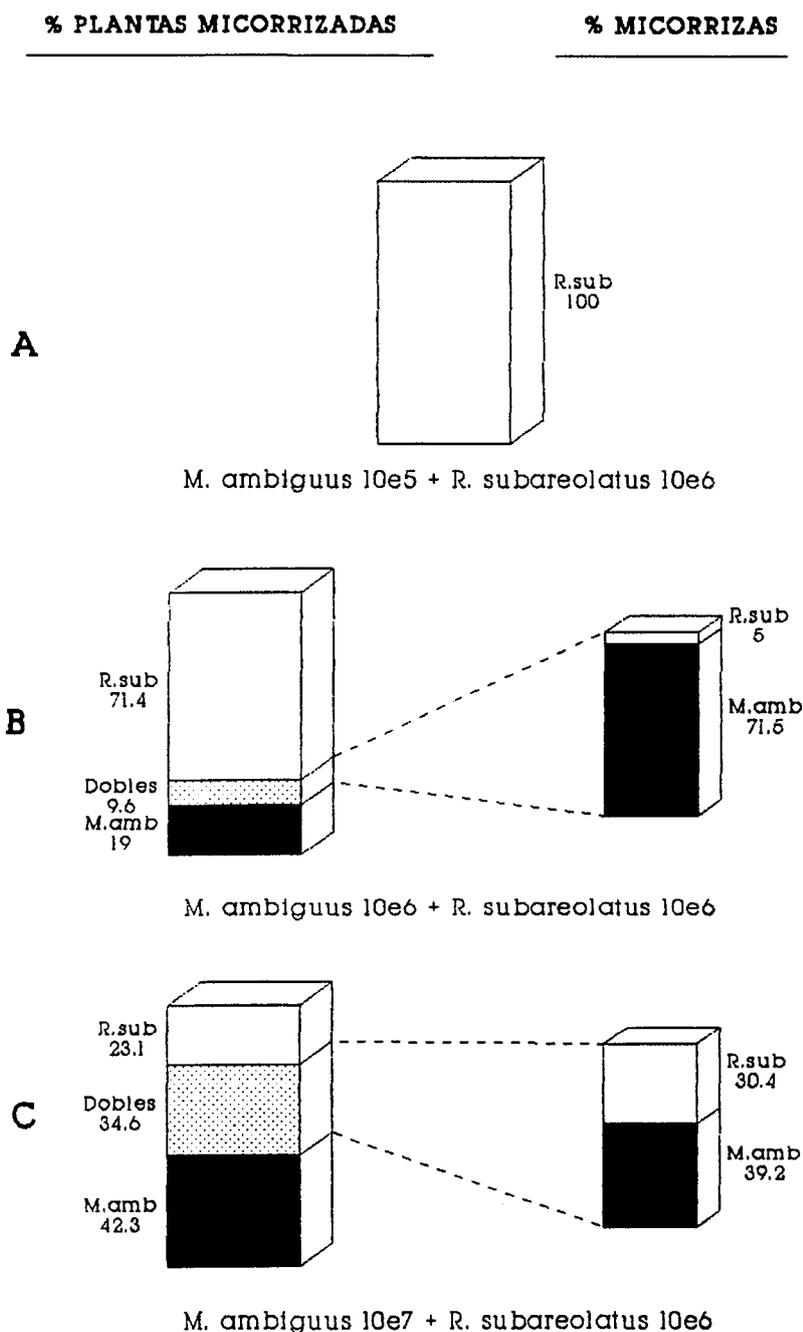
3.3.2.3. Discusión

La coexistencia de *L. bicolor* con *R. subareolatus* no pudo ser obtenida en condiciones axénicas y uniformes *in vitro* mediante inóculo líquido. Sin embargo, en contenedor las condiciones del sustrato varían al incorporar el inóculo miceliar, compuesto principalmente por vermiculita. El incremento de vermiculita al incrementar la dosis de *L. bicolor* implica una ligera subida del pH del sustrato y un descenso de la capacidad de retención de agua por la disminución de la proporción de turba. La inoculación con una dosis 1:8 de inóculo miceliar supone una proporción final aproximada de turba y vermiculita de 1:1.3 (v:v) en el sustrato, que conlleva un ligero aumento del pH. Estas condiciones pudieron permitir el desarrollo de *R. subareolatus*

FIGURA 3.3.2.(b)

Porcentaje de plantas de abeto de Douglas con micorrizas monoespecíficas y dobles tras la inoculación mixta con *Rhizopogon subareolatus* (10^6 esporas/planta) + *Melanogaster ambiguus* aplicado a 3 dosis de esporas (10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/planta).

Las frecuencias obtenidas entre tratamientos se compararon mediante tablas de contingencia. Los tratamientos que comparten la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).



únicamente cuando *L. bicolor* encontró más dificultades para crecer y colonizar el sistema radicular al cambiar las condiciones del sustrato. Las dosis menores de *L. bicolor* no disminuyeron su infectividad ya que este aislamiento puede formar ectomicorrizas a bajas concentraciones de inóculo. Esta hipótesis explicaría el incremento de plantas micorrizadas con *L. bicolor* al disminuir la dosis de éste hongo hasta la desaparición de las plantas micorrizadas con *R. subareolatus* en condiciones de crecimiento más favorables para *L. bicolor*. En este caso, la capacidad competitiva de *L. bicolor* y, probablemente, la presencia de micelio infectivo antes de la germinación de esporas de *R. subareolatus* impidió el desarrollo de micorrizas de esta especie.

Las plantas con infecciones dobles estaban micorrizadas principalmente con *R. subareolatus*. Según la hipótesis anterior, el establecimiento de *R. subareolatus* en el sistema radicular implica la presencia muy escasa de *L. bicolor*. En estas condiciones, las micorrizas formadas por esta última especie se limitan a la colonización de la parte inferior del sistema radicular tras el relativamente rápido establecimiento de un hongo específico como *R. subareolatus* que coloniza principalmente la zona superior del sistema radicular de la planta.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en cultivo puro en cuanto a la capacidad competitiva de *L. bicolor* frente a *R. subareolatus*. Los resultados obtenidos por Chu-Chou y Grace (1985) con *R. luteolus* y *R. roseolus* inoculados conjuntamente con *L. laccata* muestran un reparto equitativo de las micorrizas en el mismo sistema radicular. En este caso, la inoculación de *L. laccata* se realizó en forma de esporas, por lo que la capacidad de germinación de éstas puede condicionar el resultado del ensayo y lo hace difícilmente comparable a los resultados obtenidos con micelio de inmediata capacidad colonizadora.

La combinación óptima de inóculo para obtener plantas con infecciones dobles de *L. bicolor* y *R. subareolatus* en las condiciones ensayadas es

L. bicolor 1:16 + *R. subareolatus* 10^6 esporas / planta. En estas condiciones, se pueden conseguir alrededor de un 40 % de plantas con los dos tipos de micorrizas en el mismo sistema radicular, aunque la dificultad de controlar las condiciones experimentales hace que el equilibrio se desplace en un 60 % de las plantas hacia la presencia mono-específica de *L. bicolor* o *R. subareolatus*.

La capacidad colonizadora de *M. ambiguus* frente a *R. subareolatus* mostró un comportamiento directamente proporcional a la dosis de esporas aplicada. La obtención de plantas con micorrizas de *M. ambiguus* fue posible únicamente a las dosis superiores a 10^5 esporas / planta, a pesar de que a esta dosis se obtuvo un porcentaje de micorrizas superior al 10 % en las inoculaciones mono-específicas. La obtención de un 35 % de plantas con dos tipos de micorrizas fue posible incrementando la dosis de *M. ambiguus* a 10^7 esporas / planta. A esta dosis es posible una presión competitiva sobre *R. subareolatus* que, a igualdad de propágulos, muestra una mayor capacidad colonizadora relativa del sistema radicular que *M. ambiguus* (un hongo no específico de abeto de Douglas). Las plantas con los dos tipos de micorrizas mostraron un porcentaje de micorrizas de *M. ambiguus* ligeramente superior o superior al de *R. subareolatus*.

Los patrones de competencia entre distintas especies de hongos en las condiciones probadas muestran una dependencia de la capacidad de colonización relativa del sistema radicular de cada hongo. Esta capacidad colonizadora depende, en primer lugar, del reconocimiento mutuo planta-hongo a nivel de la superficie radicular mediante la secreción de sustancias por ámbos simbiontes (Piché et al. 1982, 1983a, 1983b) y, posteriormente, de la extensión rápida de las hifas en el sistema radicular (Piché et al. 1988). Esta proliferación de hifas varía según la combinación hongo-planta (Piché et al. 1988). En el caso de *L. bicolor*, la velocidad de establecimiento de ectomicorrizas es muy elevada y puede impedir el establecimiento de otros hongos en determinadas condiciones ambientales. En las combinaciones

probadas, parece que el factor de la extensión de la infección tras el reconocimiento es el implicado en la coexistencia de dos tipos de micorrizas simultáneamente.

La distribución espacial y temporal del inóculo y las condiciones de crecimiento, son factores que pueden controlarse en la producción de planta forestal en vivero para la obtención de distintos tipos de micorrizas en el mismo sistema radicular.

4. INFECTIVIDAD Y RECEPTIVIDAD DE SUELOS FORESTALES

La efectividad de la inoculación de plantas de vivero con hongos ectomicorrícicos requiere la persistencia del hongo posterior al trasplante a campo, siendo deseable que el hongo se extienda rápidamente en el suelo durante el establecimiento inicial de la planta (Trappe 1977; Marx 1980).

Uno de los parámetros más importantes para la selección de hongos ectomicorrícicos es su adaptación a la zona de reforestación (Mikola 1973; Perry et al. 1987). La introducción de hongos ectomicorrícicos adaptados puede reducir el estrés de trasplante. Por el contrario, la falta de adaptación del hongo inutiliza los esfuerzos realizados en la inoculación de las plantas en la fase de producción en vivero, y puede llegar a dificultar la supervivencia y crecimiento de la planta (Kropp y Langlois 1990). La adaptabilidad ecológica de un hongo ectomicorrícico depende de los mecanismos metabólicos desarrollados para hacer frente a la variación ambiental, ya sea el tipo de suelo, clima o interacciones con otros microorganismos (Trappe 1977).

La presencia o carencia de hongos ectomicorrícicos nativos capaces de infectar la especie forestal con la que se va a repoblar, debe ser evaluada en las zonas de plantación para determinar la necesidad de utilizar plantones que ya vengan inoculados del vivero (Kendrick 1988). Es generalmente aceptado que aquellas zonas forestales que mantienen una elevada población de hongos simbioses no requieren la introducción de plantas micorrizadas artificialmente en viveros (Mikola 1973; Kropp 1982). Sin embargo, diversos estudios ecológicos indican que la población nativa de hongos simbioses disminuye o es modificada en su composición tras la tala generalizada de árboles que no es seguida de repoblación, o por efecto del fuego (Harvey et al. 1980; Persson 1982; Parke et al. 1984; Perry et al. 1987). Diversos trabajos realizados en el Reino Unido indican que las especies fúngicas evolucionan desplazándose una a otras a lo largo de la sucesión del bosque

(Mason et al. 1983; Dighton y Mason 1985; Mason et al. 1985; Dighton 1987). Se postula que los hongos propios de las etapas maduras de la sucesión no colonizan las raíces de plantas jóvenes o lo hacen escasamente (Danielson 1988; Marx y Cordell 1988).

La receptividad de un suelo forestal a la simbiosis micorrícica, definida por Duvert (1987) como su aptitud para mantener la simbiosis y permitir su desarrollo, depende de las propiedades físico-químicas del suelo y de sus propiedades microbianas (Garbaye 1983; De Oliveira 1988). En la rizosfera existen comunidades microbianas muy complejas que pueden interactuar con los hongos ectomicorrícicos favoreciendo o inhibiendo la simbiosis (Bowen y Theodorou 1979; Garbaye y Bowen 1987; De Oliveira y Garbaye 1989; Duponnois y Garbaye 1991).

Los hongos ectomicorrícicos nativos existentes en el suelo de la plantación, constituyen una competencia directa para el hongo micorrícico introducido con las plantas inoculadas. En este sentido, es preciso evaluar la competitividad de un hongo ectomicorrícico definida por Garbaye (1983) como su capacidad de mantenerse bajo determinadas condiciones ecológicas en plantación y de colonizar las nuevas raíces producidas por la planta. El efecto beneficioso de las micorrizas sobre la planta dependerá, en parte, de la capacidad competitiva del hongo ectomicorrícico.

Perrin et al. (1988) definieron los conceptos de infectividad y receptividad para abordar el estudio del comportamiento de distintas cepas de hongos ectomicorrícicos introducidos en diferentes suelos. La infectividad de un suelo se definió como su capacidad para inducir la micorrización en una población de plantas hospedadoras. La receptividad de un suelo se definió como su capacidad de permitir el desarrollo de la asociación micorrícica en plantas hospedadoras a partir de un inóculo introducido.

Actualmente no existen pruebas de laboratorio simples y fiables para determinar de una manera rápida la receptividad de un suelo forestal a la introducción de una determinada cepa de hongo ectomicorrícico, y su

competitividad frente a otros simbioses. El objetivo de este capítulo es el estudio de la evolución del sistema radicular de plantas micorrizadas con distintos hongos ectomicorrícicos y trasplantadas a contenedores con distintos suelos de plantación. La primera parte del estudio se dedica a la determinación del potencial infectivo de los suelos utilizados, para establecer una primera predicción del potencial infectivo de distintos suelos de plantación y valorar la presión competitiva de los hongos ectomicorrícicos nativos. La segunda parte tiene como objetivo la determinación de la persistencia de las micorrizas de un determinado hongo, así como su efecto en el crecimiento de la planta posteriormente al trasplante a distintos suelos en contenedor. Los datos obtenidos se discutirán en función de su aplicación para seleccionar aquellas cepas de hongos con posibilidades de establecimiento en condiciones reales de campo, a partir de una aproximación experimental en condiciones controladas.

4.1 MATERIAL Y METODOS

Determinación del potencial infectivo de distintos suelos forestales

La recolección de un total de cuatro suelos forestales para la realización de este ensayo se efectuó en otoño de 1991 en distintas zonas ecológicas, dentro del área potencial de plantación del abeto de Douglas. Las denominaciones y características de las áreas de recolección de los distintos suelos se presentan en la Tabla 4.(a).

El procedimiento de recolección consistió en la excavación del suelo hasta una profundidad de 20 cm., considerada como la zona en inmediato contacto con el sistema radicular de la planta tras la plantación, y su tamizado a través de una luz de 5 mm. para extraer piedras y restos de vegetación. El suelo tamizado se mezcló para homogeneizar las fracciones de suelo

TABLA 4.(a)

Denominación y características de las áreas de recolección de los suelos utilizados en los ensayos de infectividad y receptividad.

DENOMINACION	FECHA RECOLECCION	LOCALIDAD RECOLECCION	CARACTERISTICAS ECOLOGICAS
PLANTACION	Octubre 1991	Sta. Fe del Montseny (Girona)	Altitud: 1000 m. Plantación de abeto de Douglas de 4 años. Vegetación circundante de <i>Fagus sylvatica</i> y <i>Pseudotsuga menziesii</i> . Previamente ocupado por vegetación arbustiva de <i>Sarothamnus</i> sp. y <i>Pteridium</i> sp. tras abandono de artigas donde se cultivaban patatas.
DOUGLAS	Sept. 1991	Sta. Fe del Montseny (Girona)	Altitud: 1100 m. Plantación densa de abeto de Douglas de 40 años. Vegetación circundante de <i>Pseudotsuga menziesii</i> y <i>Fagus sylvatica</i> . Previamente existía una artiga donde se cultivaban patatas.
HAYEDO	Sept. 1991	Sta. Fe del Montseny (Girona)	Altitud: 1100 m. Bosque de hayas de unos 50 años. Entorno compuesto exclusivamente por <i>Fagus sylvatica</i> .
EUSKADI	Sept. 1991	Zegama (Gipuzkoa)	Altitud: 1300 m. Prado abandonado dedicado antiguamente al pastoreo y colonizado por <i>Sarothamnus</i> sp. y <i>Ulex</i> sp. Entorno compuesto por bosques de <i>Fagus sylvatica</i> y plantaciones de <i>Larix decidua</i> .

correspondientes a los distintos horizontes recolectados. Una muestra de cada suelo se analizó para determinar textura y composición química y el resto se transportó a una cámara refrigerada a 4°C, donde se mantuvo durante un período máximo de 2 días hasta su utilización. Los resultados de los análisis

de suelo se presentan en la Tabla 4.(b).

La determinación del potencial infectivo de cada suelo se realizó a partir de una serie de diluciones, mediante la mezcla del suelo con distintas proporciones del mismo suelo autoclavado a 120°C durante una hora, según la técnica descrita por Perrin et al. (1988). Las diluciones realizadas para cada suelo y expresadas en porcentaje de suelo natural (no estéril) respecto al total fueron: 100, 50, 25, 12, 6, y 3. Las distintas diluciones de suelo preparadas se distribuyeron en contenedores Spencer-Lemaire root-trainers de 300 cc. de capacidad en los que se trasplantaron plantas de abeto de Douglas de 5 meses de edad producidas previamente en contenedores Spencer Lemaire root-trainers de 175 cc. en un substrato de turba y vermiculita (1:1, v:v). El origen de la semilla utilizada fue 261 (lote n° 313-1980).

Previamente al trasplante, se lavaron cuidadosamente con agua los sistemas radiculares de las plantas y se comprobó la ausencia de ectomicorrizas. Se prepararon un total de cinco repeticiones para cada dilución y para cada uno de los cuatro tipos de suelo, con lo que el número total de contenedores preparados fue de 120.

Las plantas se mantuvieron durante 110 días en un invernadero de cristal climatizado con temperaturas entre 20 y 25°C y humedad superior al 40% bajo condiciones de crecimiento descritas anteriormente en la sección 3.1., con la salvedad que no se realizó ninguna fertilización durante el período de crecimiento de las plantas.

Al final del período de crecimiento, se limpiaron cuidadosamente con agua los sistemas radiculares de las plantas, y se determinó el porcentaje de micorrizas formadas en cada dilución de suelo.

Los resultados se expresaron gráficamente para cada suelo como el porcentaje de micorrizas nativas obtenido respecto a la dilución de suelo expresada en una escala logarítmica. La expresión de la densidad de inóculo en una escala logarítmica ha sido recomendada para su uso en la representación de infecciones de patógenos en plantas por Van der Plank

TABLA 4.(b)

Análisis de los distintos suelos utilizados.

PARAMETROS	SUELOS			
	PLANTACION	DOUGLAS	HAYEDO	EUSKADI
pH (agua)	4.93	4.95	5.18	4.94
pH (KCl)	3.83	4.07	4.36	3.96
C org. (%)	4.02	3.34	4.57	2.65
Mat. org. (%)	6.93	5.76	7.88	5.30
N total (%)	0.30	0.24	0.33	0.25
C / N	13.40	13.90	13.80	10.41
NO ₃ ⁻ (mg./Kg.)	83.20	68.10	59.70	49.62
P. ext. (mg./Kg.)	41.70	49.70	1.40	0.65
Na (meq./100g.)	0.05	0.10	0.12	0.29
K (meq./100g.)	0.04	0.22	0.19	0.39
Mg (meq./100g.)	0.28	0.57	1.07	3.59
Ca (meq./100g.)	2.22	6.01	8.08	2.58
C.I.C. (meq./100g.)	5.53	8.12	11.72	13.80
GRANULOMETRIA	franco-arenoso	franco-arenoso	franco-arcilloso	arcilloso

(1975), por la concentración de los datos en una escala de diluciones proporcional. Igualmente, se determinó para cada suelo la diversidad de tipos morfológicos de micorrizas detectados.

Determinación de la receptividad de distintos suelos forestales

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo 3, se seleccionaron aquellos hongos ectomicorrícicos que formaron un porcentaje elevado de micorrizas en condiciones de contenedor. A partir de los hongos seleccionados, se produjeron distintos tipos de inóculo según metodología descrita en el capítulo 3. Los hongos utilizados y el método de producción de inóculo se representan en la Tabla 4.(c).

Los distintos tipos de inóculo preparados se aplicaron a plantas de abeto de Douglas producidas a partir de semillas procedentes de Oregon (origen 261, lote nº 313-1980). Las plantas se produjeron en contenedores Spencer-Lemaire root-trainers de 175 cc. de capacidad con un substrato de turba y vermiculita (1:1, v:v). Los distintos tipos de inóculo vegetativo se aplicaron en el momento de la siembra de las semillas, mediante mezcla manual del inóculo con el substrato de crecimiento a las dosis óptimas descritas en el capítulo 3. Las esporas se aplicaron en forma de suspensión en agua un mes después de la germinación de las semillas, e igualmente a las dosis óptimas establecidas en el capítulo 3. La combinación doble se aplicó a la dosis 1:8 (v:v, inóculo:substrato) para *L. bicolor* S-238 en el momento de la siembra + 10^6 esporas de *R. subareolatus* por planta, que se aplicaron un mes después de la germinación de las semillas. La utilización de dos tipos de inóculo de *L. bicolor* y la variabilidad del porcentaje de micorrizas formado tras la inoculación con esporas de *R. subareolatus*, permitió separar lotes de plantas con dos niveles de micorrización, superior e inferior al 50%, para las dos especies. Se prepararon 64 plantas para cada tratamiento de inoculación estudiado, incluyendo plantas control no inoculadas, con lo que el total de plantas utilizadas fue de 448.

Las plantas se mantuvieron durante cinco meses (de Mayo a Septiembre) en un invernadero de cristal climatizado a 20-25°C de temperatura

TABLA 4.(c)

Hongos ectomicorrícicos utilizados para la producción de inóculo en los ensayos de receptividad de suelos y método de producción. Los datos de recolección de cada hongo se detallan en el capítulo 3.

HONGOS	TIPO DE INOCULO
<i>Laccaria bicolor</i> S-238	Vegetativo (turba:vermiculita)
<i>L. bicolor</i> S-238	Inclusión en alginato
<i>Melanogaster ambiguus</i>	Suspensión de esporas
<i>Rhizopogon subareolatus</i>	Suspensión de esporas
<i>Tuber maculatum</i>	Suspensión de esporas
<i>L. bicolor</i> S-238 + <i>R. subareolatus</i>	Vegetativo: Lb + esporas: Rs

y con humedad relativa superior al 40%. Las condiciones de riego, luz y fertilización se detallan en la sección 3.1. La localización de las plantas dentro del invernadero se sometió a rotación periódica para eliminar los posibles efectos posicionales.

Tras el período de crecimiento, se examinó el sistema radicular de las plantas para determinar el porcentaje de micorrizas formadas y se tomaron los datos de crecimiento (altura y diámetro basal) de cada planta. Posteriormente se trasplantaron ocho plantas de cada tratamiento a contenedores Spencer-Lemaire root-trainers de 300 cc. de capacidad conteniendo los distintos suelos probados en los ensayos de infectividad. La realización de este ensayo se efectuó simultáneamente a la determinación de la infectividad para uniformizar las condiciones ambientales bajo las que se realizaron ámbos experimentos.

Después del trasplante, los contenedores se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento en invernadero, en ausencia de fertilización, durante 110 días (de Septiembre a Diciembre). El crecimiento activo de las plantas se mantuvo durante toda la duración del ensayo mediante el control de luz y temperatura. Al final de este período, se determinó el porcentaje de micorrizas formadas por el hongo estudiado y el porcentaje de micorrizas formadas por otros hongos, a partir de un submuestreo estratificado de raíces laterales primarias. Previamente a la realización del submuestreo de raíces para la determinación del porcentaje de micorrización, se determinó el número de raíces necesario para obtener una representatividad estadísticamente aceptable. Igualmente, se registraron los parámetros de crecimiento (altura y diámetro basal) de cada planta.

Los resultados de micorrización se expresaron en porcentajes de micorrizas formadas por el hongo/s introducido/s antes y después del trasplante, comparando los porcentajes medios mediante análisis de la varianza y representando el nivel de significación de F. Los datos de porcentajes de micorrizas se modificaron mediante transformación angular ($\arcsen \sqrt{\% \text{ mic}/100}$) y se comprobó la distribución normal y homogeneidad de las varianzas del error experimental (Snedecor y Cochran 1980).

Análisis de parámetros de crecimiento

Los datos de diámetro basal, altura y volumen de las plantas ((Diámetro basal)² x Altura) al final del ensayo, se procesaron globalmente mediante análisis de la covarianza de dos vías. Los factores considerados fueron: el tratamiento de inoculación con los distintos hongos probados y el tipo de suelo (Plantación, Douglas y Hayedo), considerando como covariables el diámetro basal, altura y volumen inicial de las plantas. A partir de este primer análisis de los datos, se determinó el nivel de significación de la interacción: hongo x suelo para cada parámetro de crecimiento considerado, con lo que

se estableció el tipo de análisis más adecuado para la comparación del efecto de cada hongo. En el caso de interacciones no significativas (nivel de significación > 0.05), los datos se analizaron globalmente. Para interacciones significativas (nivel de significación ≤ 0.05) los datos se analizaron separadamente para cada suelo.

4.2 RESULTADOS

Ensayos de infectividad de suelos

La representación del porcentaje de micorrizas formado en las distintas diluciones de los suelos utilizados se representa en la Figura 4.(a) sobre una escala de diluciones logarítmica.

La formación de micorrizas en plantas trasplantadas al suelo de Plantación ha tenido lugar únicamente en el suelo sin diluir, con un porcentaje ligeramente superior al 20% de raíces cortas micorrizadas.

En el suelo de Douglas se ha detectado la formación de micorrizas a todas las diluciones probadas, aunque el porcentaje de micorrizas formado ha resultado bajo, oscilando entre el 10 y el 15% a las proporciones de suelo natural más elevadas. La formación de micorrizas en el suelo de Hayedo ha resultado elevada a todas las diluciones probadas, con porcentajes entre el 40 y 75%. Los porcentajes máximos de micorrización se obtuvieron a las concentraciones de suelo natural iguales o superiores al 12%. Las plantas trasplantadas al suelo de Euskadi no mostraron ningún tipo de micorriza en el sistema radicular tras el período de crecimiento.

Los tipos morfológicos de micorrizas detectados en cada suelo se describen en la Tabla 4.(d). La mayor diversidad de tipos morfológicos de micorrizas se detectó en el suelo de Hayedo, con ocho tipos distintos. En el suelo de Douglas se describieron seis tipos morfológicos y en el suelo de Plantación, únicamente tres.

FIGURA 4.(a)

Porcentaje de micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses trasplantadas a contenedores con distintos suelos para determinar su infectividad. El volumen inicial de cada tipo de suelo (300 cc.) se diluyó sucesivamente a la mitad con el mismo suelo estéril. El porcentaje de suelo natural se representa sobre escala logarítmica. Cada punto corresponde a la media de 5 plantas.

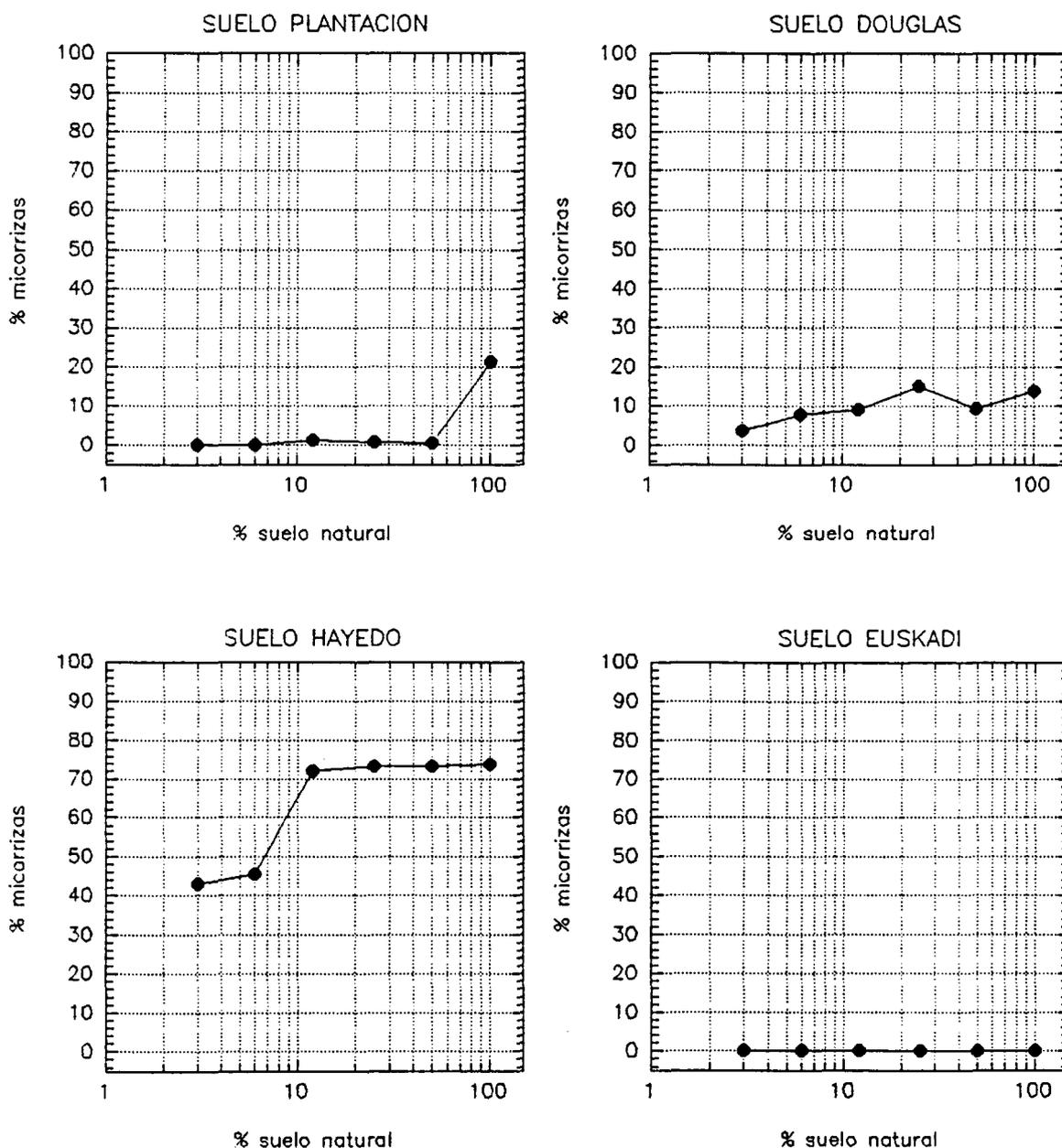


TABLA 4.(d)

Tipos de micorrizas nativas detectadas en distintos suelos forestales mediante bioensayo con plantas de abeto de Douglas de 5 meses trasplantadas en contenedores de 300 cc.

DENOMINACION SUELO	TIPOS MICORRIZAS	DESCRIPCION (*)
PLANTACION	3	Tipos: c, d, e.
DOUGLAS	6	Tipos: a, b, d, e, f, g.
HAYEDO	8	Tipos: b, c, d, f, g, h, i, j.
EUSKADI	0	Tipos: -

(*):

Tipo a Micorrizas lisas de color marrón oscuro en forma de maza, simples y con manto muy delgado.

Tipo b Micorrizas lisas tipo *Laccaria* de color rosado y ramificación simple.

Tipo c *Cenococcum geophilum*

Tipo d Micorrizas lisas de color miel tipo *Tuber* con ramificación pinnada o simple.

Tipo e Micorrizas blancas con abundante micelio externo y rizomorfos tipo *Rhizopogon*.

Tipo f Micorrizas lisas de color verdoso oscuro.

Tipo g Micorrizas negras lisas parecidas al tipo *Cenococcum* aunque sin micelio externo.

Tipo h Micorrizas lisas con micelio externo ténue tipo *Hebeloma*.

Tipo i Micorrizas blancas con abundante micelio externo tipo *Suillus* sin rizomorfos aparentes.

Tipo j Micorrizas lisas de color lila vivo y cortas con micelio externo ténue.

Ensayos de receptividad de suelos

El porcentaje de micorrización de plantas de abeto de Douglas inoculadas con *L. bicolor* S-238 (inóculo vegetativo), antes y después del trasplante a los cuatro tipos de suelos probados, se representa en la Figura 4.(b). Aunque el porcentaje de micorrización inicial de las plantas fue bajo (alrededor del 30%), el porcentaje de micorrizas final aumentó significativamente en los cuatro suelos y prácticamente no se detectó la presencia de micorrizas nativas. Es de destacar el elevado porcentaje final de micorrizas, cercano al 90% de las raíces cortas infectadas, obtenido en el suelo de Plantación. El porcentaje final de micorrizas en el suelo de Douglas resultó también significativamente mayor que el inicial, aunque fue el suelo menos receptivo a *L. bicolor* y donde se detectó el mayor porcentaje de micorrizas formadas por hongos nativos.

Las plantas inoculadas con *L. bicolor* S-238 (inóculo de alginato) formaron un porcentaje de micorrizas cercano al 70% (Figura 4.(c)). Después del trasplante a los tres suelos probados (Plantación, Douglas y Hayedo), no se detectó un cambio significativo del porcentaje de micorrización tras 110 días y la presencia de hongos nativos fue baja. Las plantas inoculadas con *M. ambiguus* presentaron un porcentaje de micorrización inicial entre el 50 y el 80% de las raíces cortas, por lo que el nivel inicial no ha sido el mismo para todos los suelos estudiados (Figura 4.(d)). El porcentaje de micorrización inicial de las plantas se mantuvo sin variación significativa en los suelos de Plantación, Douglas y Hayedo al final del ensayo. Sin embargo, el porcentaje de micorrizas de *M. ambiguus* disminuyó significativamente después del trasplante en el suelo de Euskadi. La presencia de micorrizas nativas representó cerca de un 20% de las micorrizas en el suelo de Plantación y el 5 y el 15% en los suelos de Douglas y Hayedo respectivamente. En el suelo de Euskadi no se detectó la presencia de micorrizas nativas.

Las plantas con un porcentaje inicial de micorrizas de *R. subareolatus* superior al 50% fluctuaban entre el 70 y el 75% de las raíces cortas micorrizadas (Figura 4.(e)). Después del período de trasplante a los cuatro tipos de suelo, el porcentaje de micorrizas aumentó significativamente en el suelo de Plantación y de Douglas, y disminuyó significativamente en el suelo de Hayedo y Euskadi. El porcentaje de micorrizas nativas formadas en el suelo de Hayedo fue muy alto, representando casi el 60% del total de las raíces cortas, mientras que en el resto de los suelos no se detectaron.

Las plantas con un porcentaje inicial de micorrizas de *R. subareolatus* inferior al 50% presentaron una media de casi el 35% de raíces cortas micorrizadas (Figura 4.(f)). El porcentaje de micorrización inicial aumentó significativamente al final del período de trasplante al suelo de Plantación y se mantuvo sin diferencias significativas en el suelo de Douglas, mientras que disminuyó significativamente en los suelos de Hayedo y Euskadi. Las micorrizas nativas constituyeron alrededor del 40% de las raíces cortas en el suelo de Hayedo y se detectó su presencia en menos del 5% de las raíces cortas de las plantas trasplantadas a los suelos de Plantación y Douglas.

Las plantas inoculadas con *T. maculatum* formaron un porcentaje de micorrizas entre el 80 y el 85%. Este porcentaje inicial se mantuvo sin diferencias significativas tras el crecimiento en los tres suelos probados (Plantación, Douglas y Hayedo)(Figura 4.(g)). La presencia de micorrizas nativas se detectó en un porcentaje de raíces cortas del 10 y el 15% en plantas trasplantadas a los suelos de Plantación y Douglas respectivamente. La presencia de micorrizas nativas en el suelo de Hayedo resultó muy escasa.

Las plantas con inoculaciones dobles de *L. bicolor* + *R. subareolatus* mostraron infecciones simultáneas en el mismo sistema radicular, con un porcentaje de micorrizas de *R. subareolatus* cercano al 60%, mientras que las micorrizas formadas por *L. bicolor* constituyeron entre el 10 y el 20% de las raíces cortas infectadas (Figura 4.(h)). El porcentaje

FIGURA 4.(b)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas por *L. bicolor* S-238 (< 50%) y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.

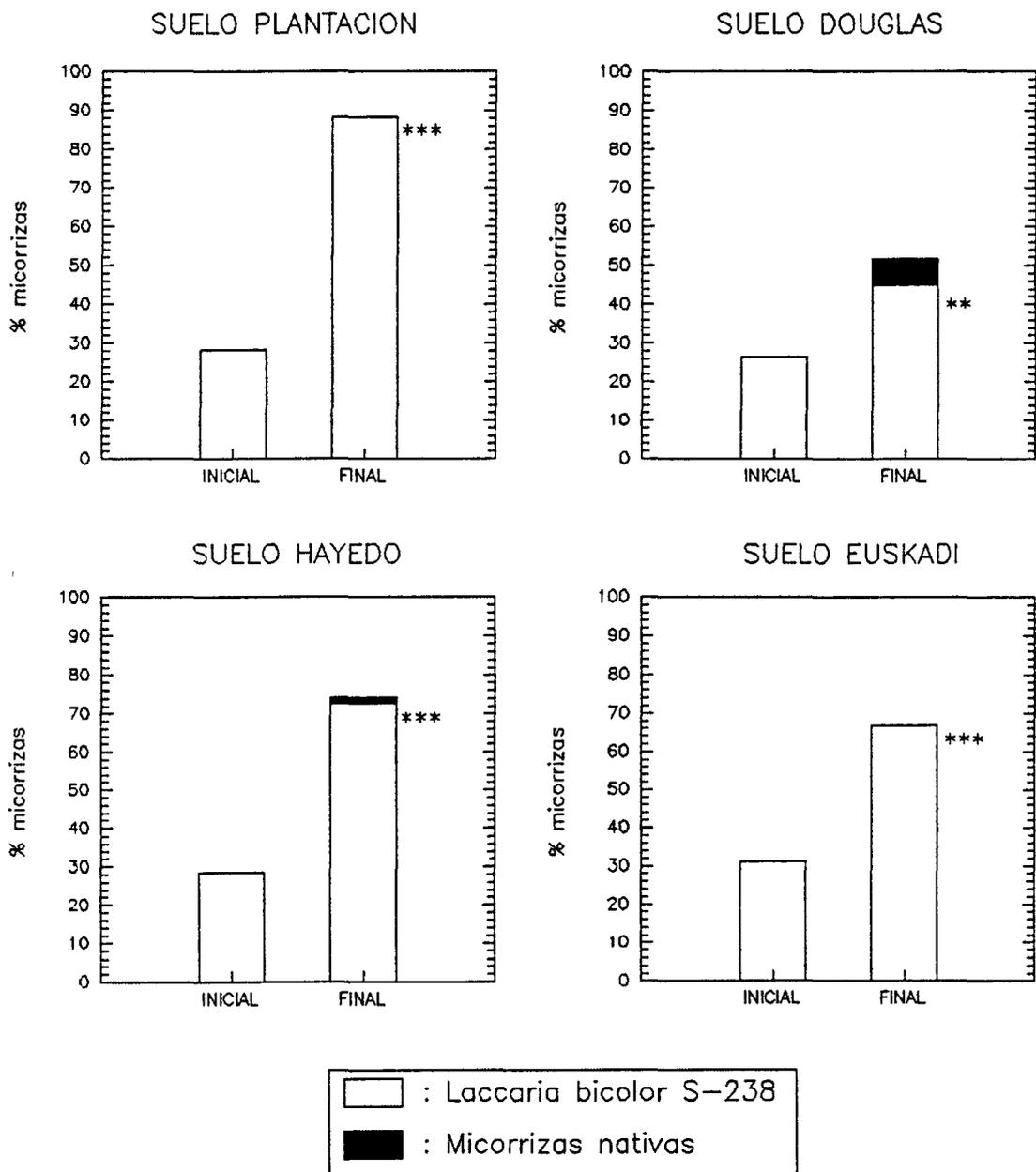


FIGURA 4.(c)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas por *L. bicolor* S-238 (> 50%) y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.

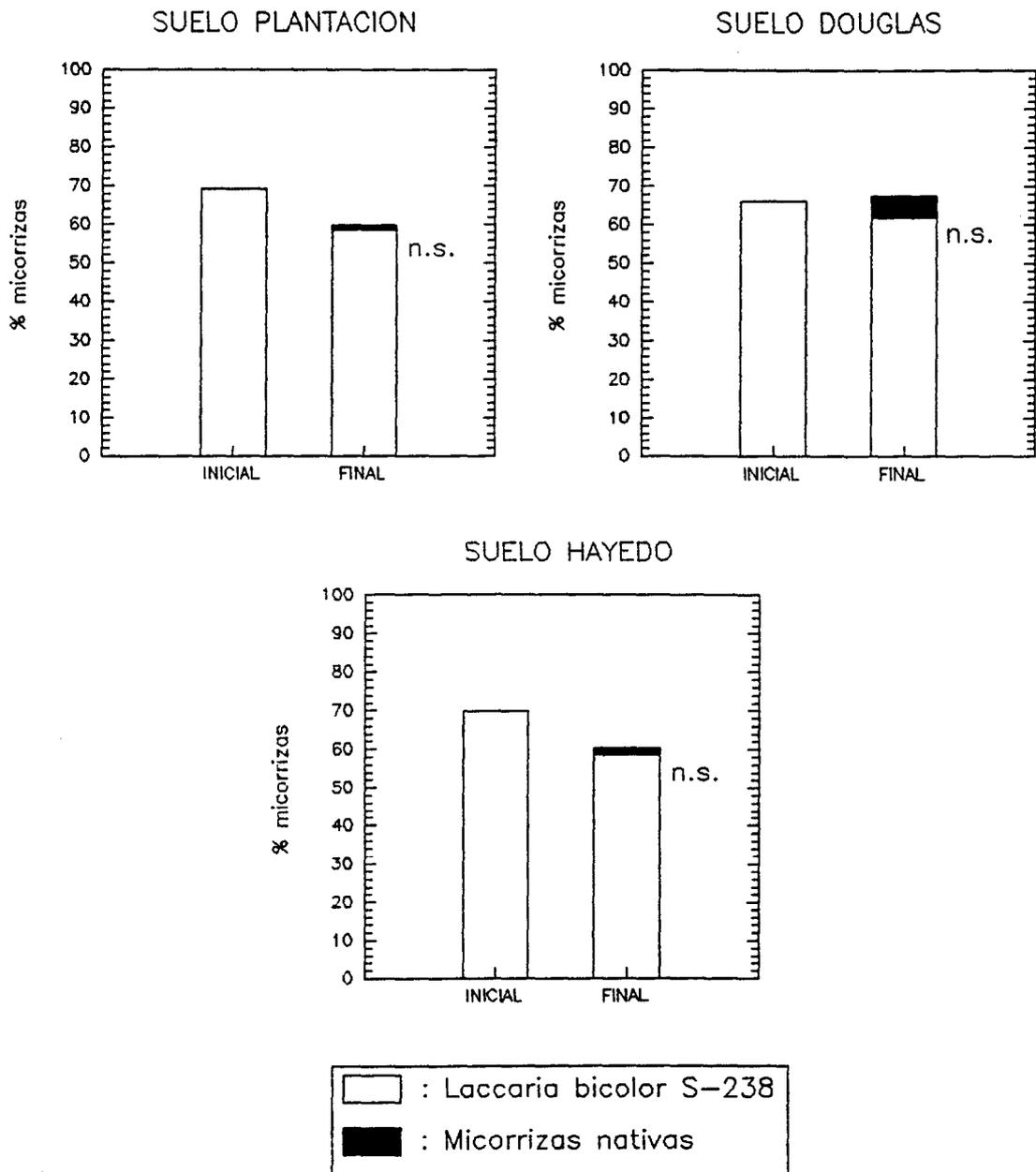


FIGURA 4.(d)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas por *M. ambiguus* y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.

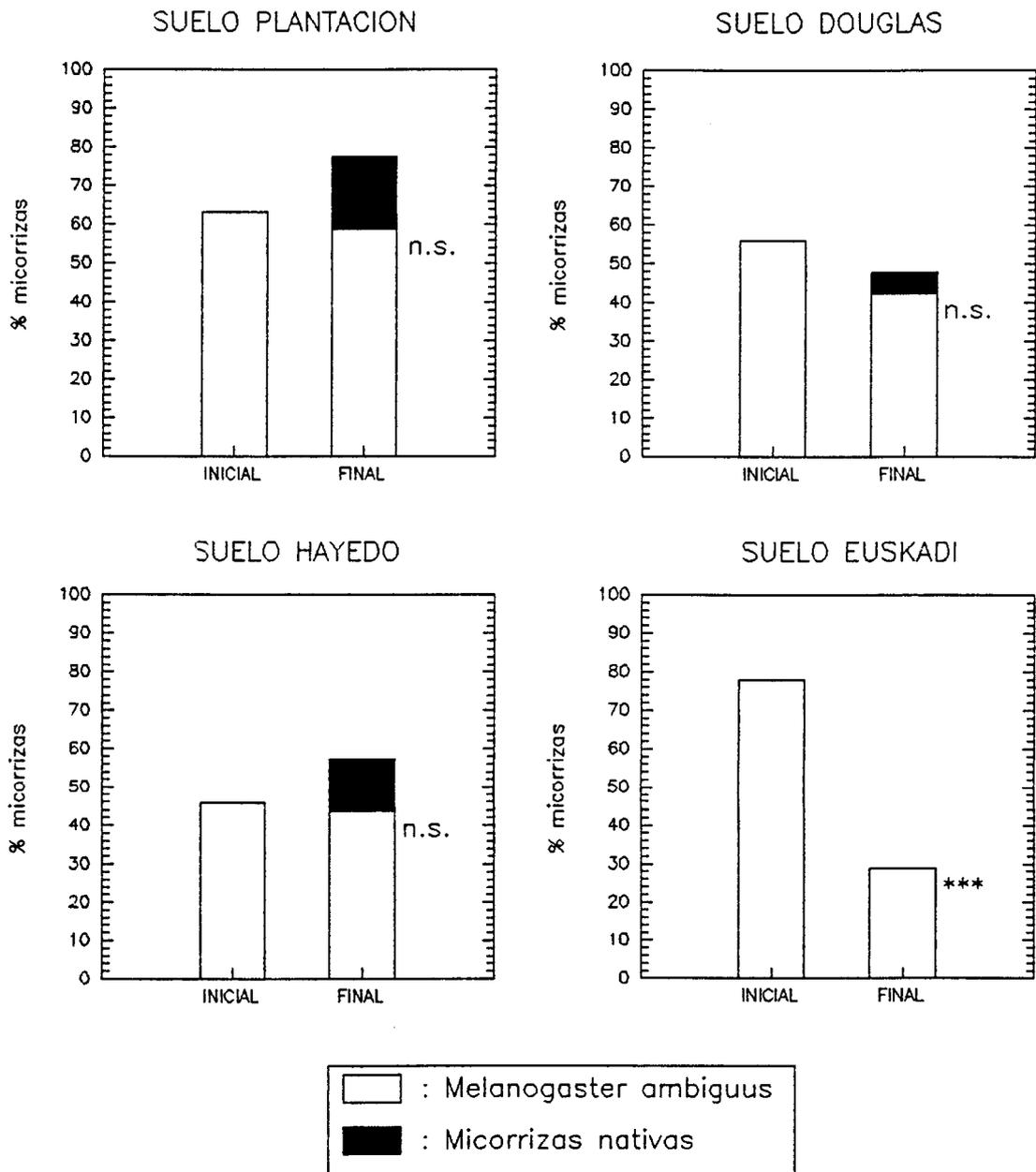


FIGURA 4.(e)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas por *R. subareolatus* (> 50%) y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.

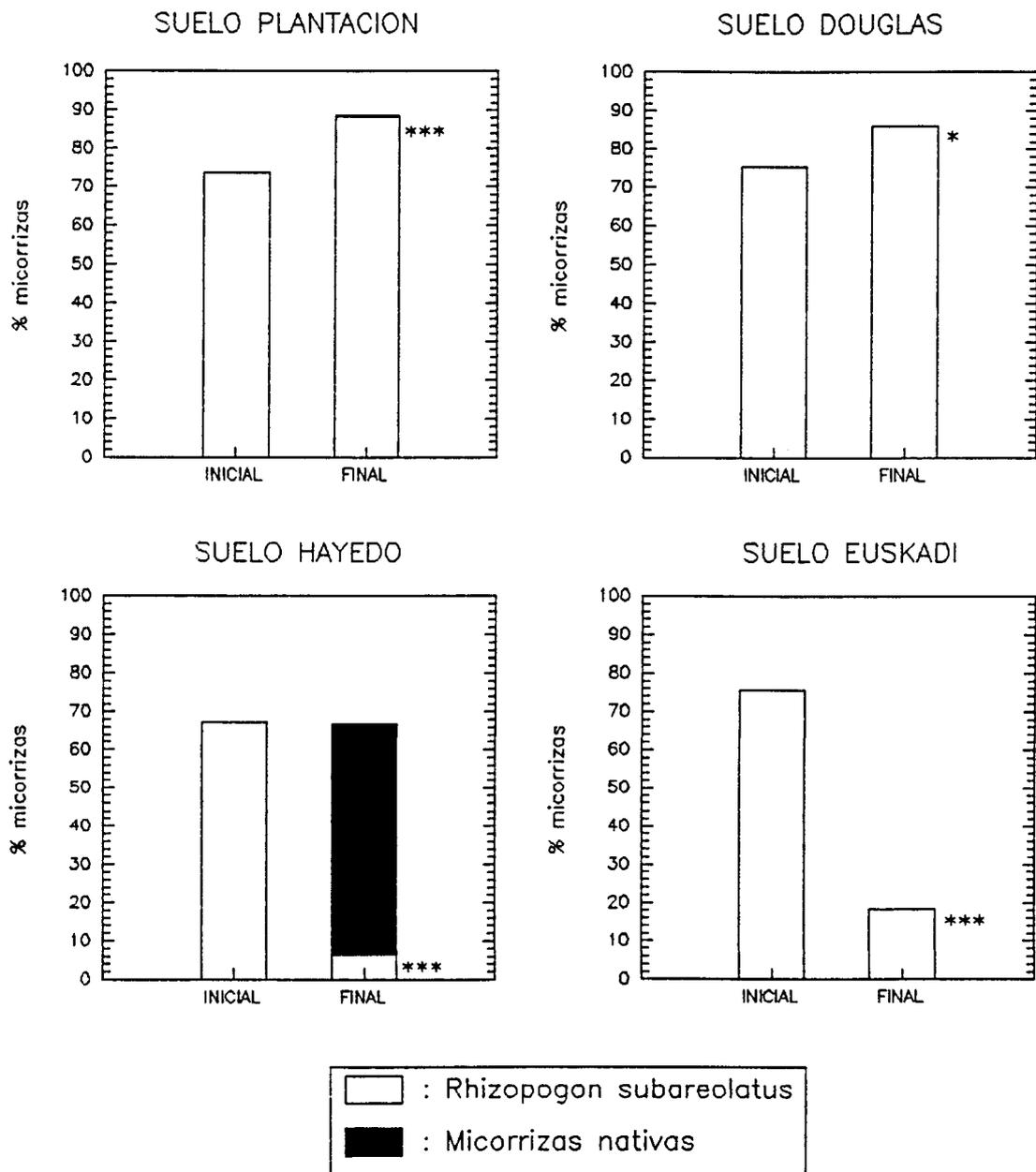


FIGURA 4.(f)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas por *R. subareolatus* (< 50%) y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.

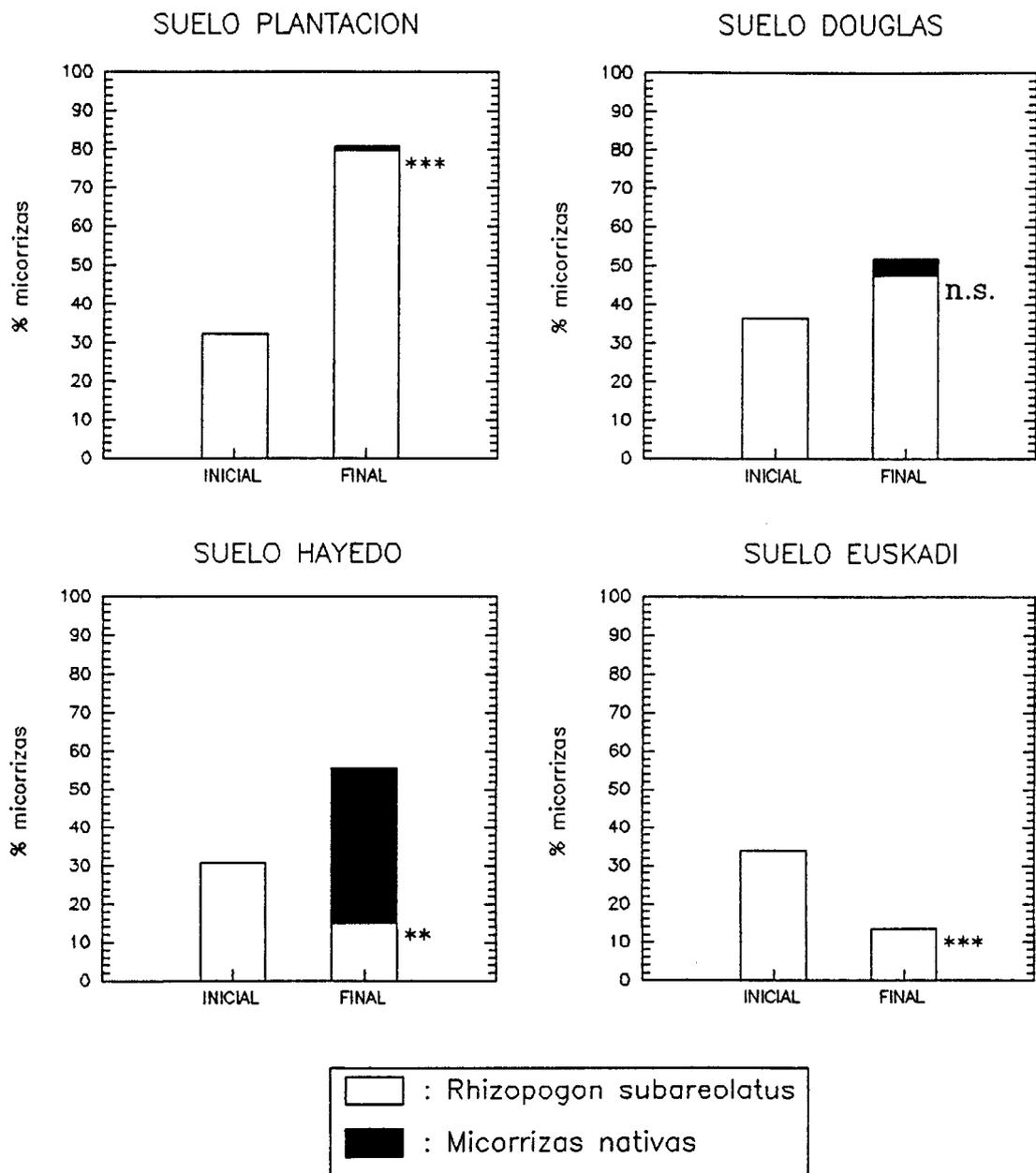


FIGURA 4.(g)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas por *T. maculatum* y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.

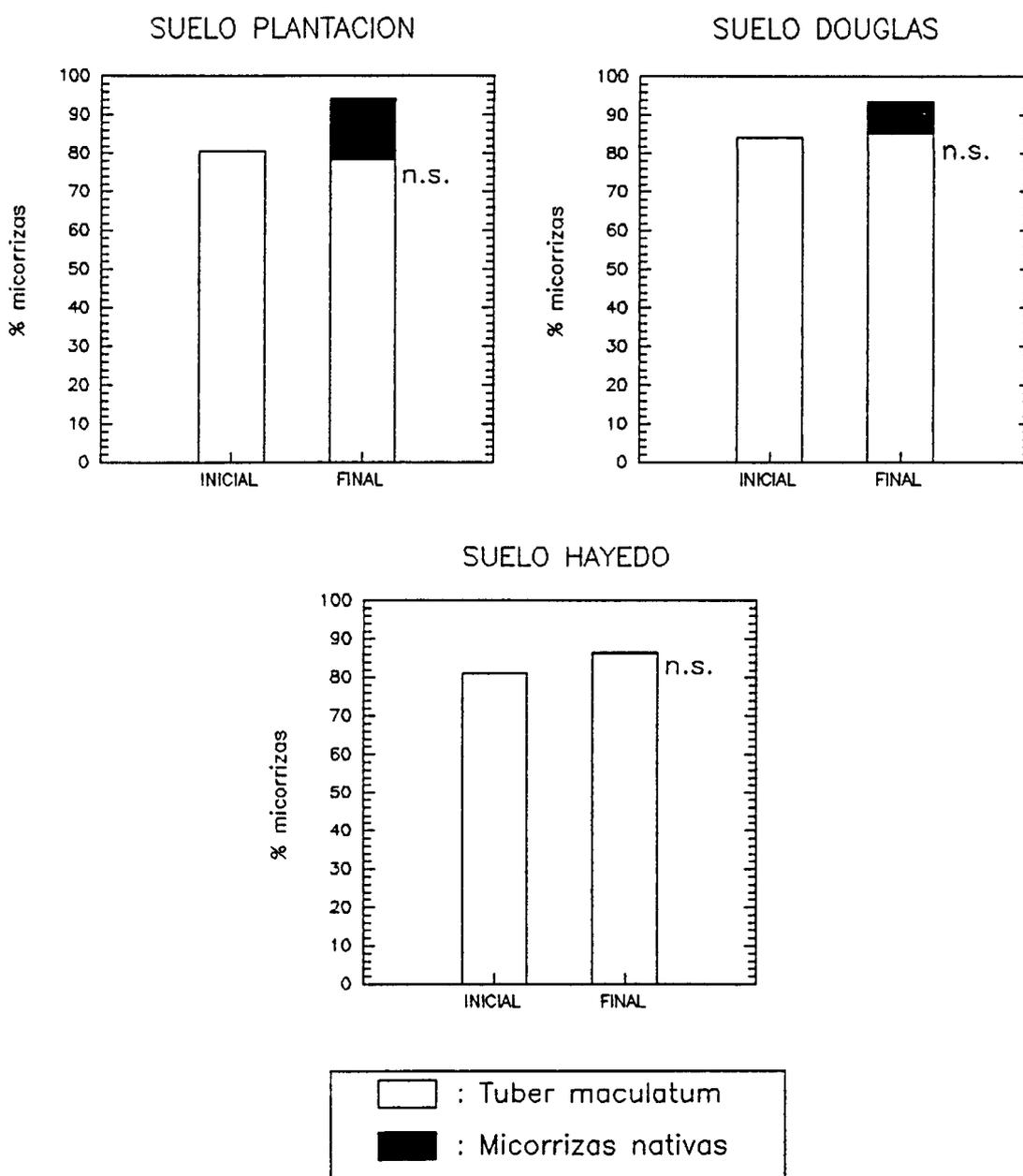
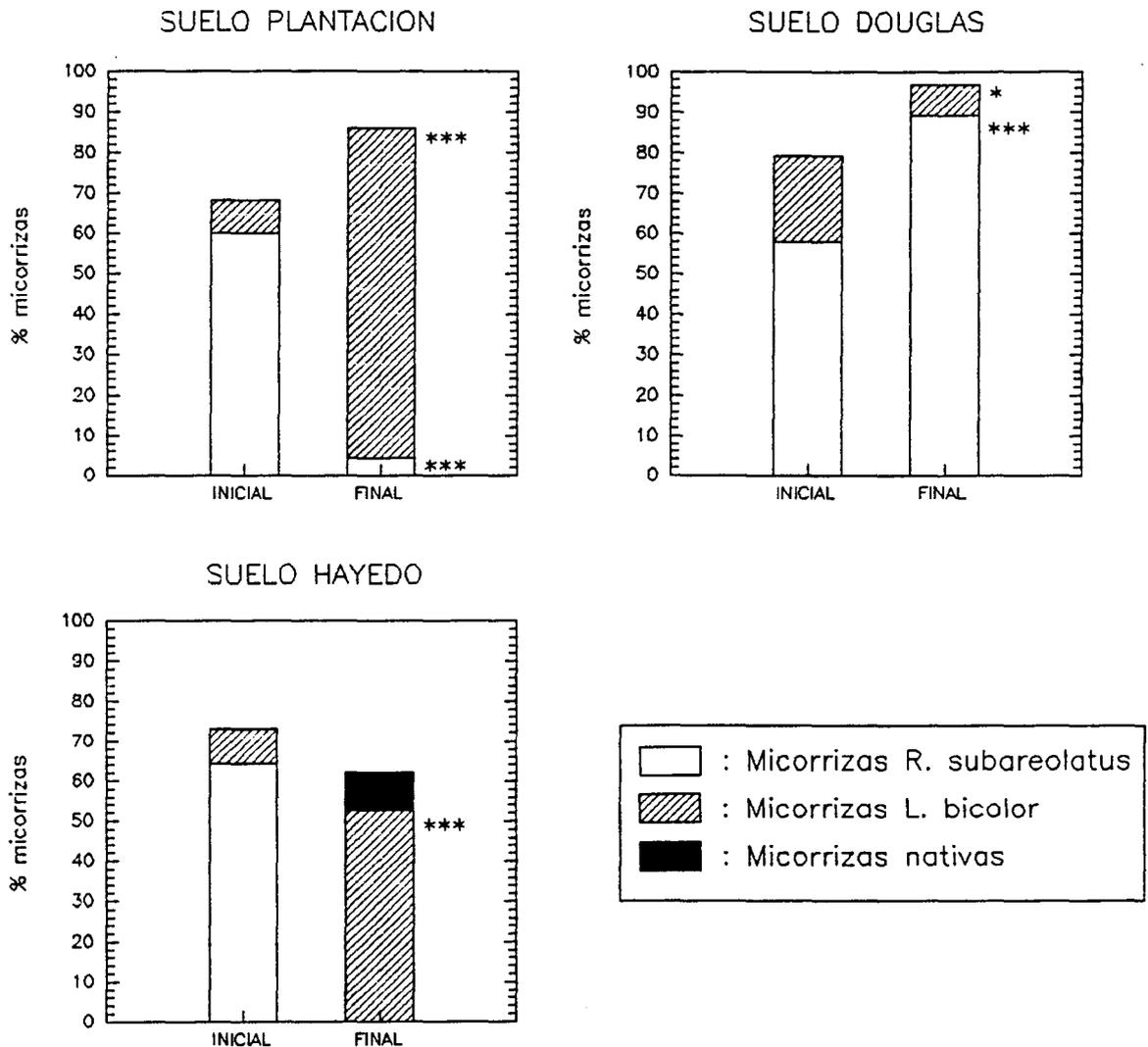


FIGURA 4.(h)

Evolución de la micorrización de plantas de abeto de Douglas de 5 meses colonizadas simultáneamente por *L. bicolor* S-238 y *R. subareolatus* y trasplantadas durante 4 meses en contenedores con distintos suelos forestales. Los porcentajes de micorrización antes y después del trasplante se compararon mediante análisis de la varianza.

Nivel de significación de F: *: ≤ 0.1 ; **: ≤ 0.05 ; ***: ≤ 0.01 ; n.s.: no significativo.



total de micorrizas osciló entre el 70 y el 80% de las raíces cortas de la planta. El porcentaje de micorrizas de *L. bicolor* al final del ensayo aumentó significativamente en los suelos de Plantación y Hayedo, disminuyendo simultáneamente y de forma significativa el porcentaje de micorrizas formadas por *R. subareolatus*, que desaparecieron por completo en el suelo de Hayedo. Por el contrario, el porcentaje de micorrizas de *R. subareolatus* aumentó significativamente en el suelo de Douglas, disminuyendo el porcentaje de micorrizas de *L. bicolor*. Las micorrizas formadas por hongos nativos se detectaron únicamente en las plantas trasplantadas al suelo de Hayedo, donde constituyeron un porcentaje cercano al 10% de las raíces cortas.

Parámetros de crecimiento

Los resultados del análisis global de la varianza de dos vías para los tres parámetros de crecimiento medidos (diámetro, altura y volumen de las plantas), se representan en la Tabla 4.(e). Los datos de diámetro basal y de volumen final de las plantas se analizaron globalmente en los tres suelos, ya que la interacción entre los factores "hongo" y "suelo" no resultó significativa. La interacción entre estos factores resultó significativa para el parámetro de altura final, por lo que su análisis se realizó para cada suelo separadamente.

Los valores de incremento de diámetro basal y volumen de las plantas al final del experimento se representan en la Tabla 4.(f). No se detectó ninguna diferencia significativa entre los valores de diámetro final de las plantas no inoculadas o inoculadas con los hongos estudiados. Las plantas inoculadas con *T. maculatum* mostraron un volumen final significativamente menor que en el resto de tratamientos exceptuando las plantas inoculadas con *M. ambiguus*. Los valores máximos de crecimiento en diámetro y volumen de las plantas correspondieron a las plantas inoculadas con los hongos *L. bicolor* < 50% y *R. subareolatus* > 50% , aunque las diferencias no

resultaron significativas respecto a las plantas control no inoculadas.

TABLA 4.(e)

Cuadro de resultados del análisis de la varianza para distintos parámetros de crecimiento.

VARIABLE	FUENTE DE VARIACION	NIVEL DE SIGNIFICACION
ALTURA FINAL	COVARIABLE Altura inicial	0.0000
	EFFECTOS PRINCIPALES Hongo	0.0000
	Suelo	0.0000
	INTERACCION Hongo x Suelo	0.0051
DIAMETRO FINAL	COVARIABLE Diámetro inicial	0.0000
	EFFECTOS PRINCIPALES Hongo	0.9675
	Suelo	0.0199
	INTERACCION Hongo x Suelo	0.4546
VOLUMEN FINAL (Diámetro) ² x Altura	COVARIABLE Volumen inicial	0.0000
	EFFECTOS PRINCIPALES Hongo	0.0011
	Suelo	0.0001
	INTERACCION Hongo x Suelo	0.2349

Los valores de altura de las plantas al final del ensayo se representan en la Tabla 4.(g). La altura final de las plantas trasplantadas en el suelo de Plantación resultó mayor en las plantas inicialmente colonizadas con niveles altos de *R. subareolatus*, aunque las diferencias con el resto de

TABLA 4.(f)

Diámetro basal y volumen final de plantas de abeto de Douglas inoculadas y no inoculadas tras 110 días de crecimiento en contenedores con distintos suelos. Los datos se procesaron mediante análisis de la covarianza, utilizando el diámetro basal y volumen inicial, respectivamente, como covariables. La comparación de medias se realizó mediante el test de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$).

HONGO	DIAMETRO BASAL (mm)	VOLUMEN (cc) (Diámetro) ² x Altura
Control (no inoculado)	3.46 a	3.39 b
<i>L. bicolor</i> > 50%	3.39 a	3.14 b
<i>L. bicolor</i> < 50%	3.47 a	3.66 b
<i>M. ambiguaus</i>	3.37 a	3.03 ab
<i>R. subareolatus</i> > 50%	3.37 a	3.44 b
<i>R. subareolatus</i> < 50%	3.41 a	3.24 b
<i>T. maculatum</i>	3.43 a	2.00 a

TABLA 4.(g)

Altura final de plantas de abeto de Douglas inoculadas y no inoculadas tras 110 días de crecimiento en contenedores con distintos suelos. Los datos se procesaron mediante análisis de la covarianza, utilizando la altura inicial en cada suelo como covariable. La comparación de medias se realizó mediante el test de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$).

HONGO	ALTURA (cm)		
	PLANTACION	DOUGLAS	HAYEDO
Control (no inoculado)	25.12 ab	29.48 bcd	25.50 bde
<i>L. bicolor</i> > 50%	24.36 ab	28.43 abcd	22.91 ab
<i>L. bicolor</i> < 50%	25.16 ab	31.03 cd	25.83 e
<i>M. ambiguaus</i>	25.29 ab	25.57 ab	23.34 abcd
<i>R. subareolatus</i> > 50%	26.56 b	32.56 d	22.35 a
<i>R. subareolatus</i> < 50%	24.19 ab	27.08 abc	23.03 abc
<i>T. maculatum</i>	21.01 a	24.32 a	21.59 a

tratamientos no resultaron significativas excepto con las plantas inoculadas con *T. maculatum*. En el suelo de Douglas, las plantas inoculadas con niveles altos de *R. subareolatus* o con *L. bicolor*, independientemente del nivel inicial de micorrización, fueron las que mostraron un mayor crecimiento en altura, sin detectarse diferencias significativas entre ellas y con las plantas control no inoculadas. En el suelo de Hayedo, el mayor crecimiento en altura se detectó en las plantas micorrizadas con *L. bicolor* < 50%, aunque no difirieron significativamente de las plantas control no inoculadas. Las plantas micorrizadas con *T. maculatum* y *R. subareolatus* > 50%, mostraron una altura final significativamente menor que las plantas no inoculadas o inoculadas con *L. bicolor* < 50%. Aunque las diferencias no fueron significativas, los valores mayores de crecimiento en altura correspondieron a las plantas inoculadas con *L. bicolor* y *R. subareolatus* en los suelos de Plantación y Douglas, aunque la micorrización con *R. subareolatus* ha resultado detrimental para en crecimiento en altura de las plantas trasplantadas al suelo de Hayedo donde las micorrizas formadas por este hongo no se mantuvieron.

4.3. DISCUSION

Ensayos de infectividad de suelos

A partir de la representación gráfica de los porcentajes de micorrización formados en plantas de abeto de Douglas trasplantadas a distintas diluciones de suelos, se ha realizado una predicción inicial de su potencial infectivo bajo determinadas condiciones ambientales.

El suelo de Plantación ha mostrado una baja concentración de propágulos infectivos de hongos ectomicorrícicos. La escasa presencia de hongos nativos puede resultar, en cierto modo, inesperada en una zona rodeada de bosques y plantaciones, aunque la falta de cobertura arbórea y

el historial previo agrícola de la zona podrían explicar la escasa detección de hongos. Sin embargo, algunos investigadores han comprobado la persistencia de una parte de hongos ectomicorrícicos tras el uso agrícola prolongado del suelo, o en ausencia de plantas hospedadoras (Mikola et al. 1964, Mikola 1973).

Los resultados obtenidos con el suelo de Douglas indicarían una densidad de hongos ectomicorrícicos relativamente elevada y diversificada, aunque poco infectivos en las condiciones experimentales establecidas, utilizando plantas jóvenes. La presencia de esporocarpos de hongos ectomicorrícicos epigeos recolectados en la zona de muestreo ha resultado escasa en comparación con la abundancia de hongos hipogeos. La dispersión de estos últimos se realiza a través de la ingestión por micromamíferos e insectos (Maser et al. 1978, 1985; Malajczuk et al. 1987), por lo que la distribución del inóculo en el suelo podría resultar más puntual que los hongos que diseminan las esporas por el viento, siendo más difícil de evaluar su abundancia en los muestreos de suelos. La utilización previa del suelo en cultivos agrícolas sugiere que el origen más probable de la mayoría de los hongos ectomicorrícicos presentes sea la diseminación de esporas y las micorrizas que pudieran presentar las plantas en el momento del trasplante.

En el suelo de Hayedo se ha detectado la presencia de una diversificada comunidad de hongos ectomicorrícicos nativos, que han formado un porcentaje elevado de ectomicorrizas incluso a bajas concentraciones de suelo natural. Estos resultados pueden considerarse como normales para un suelo de historial forestal. El hecho de que la zona muestreada corresponda a un bosque monoespecífico de *Fagus sylvatica* permite destacar la capacidad de los hongos ectomicorrícicos de esta especie para formar micorrizas con *Pseudotsuga menziesii*. Esta coincidencia de determinados hongos simbioses entre las dos especies arbóreas fue previamente observada en Francia por Le Tacon et al. (1983).

La falta de micorrizas detectada en las plantas trasplantadas al suelo de

Euskadi podría deberse a la escasez de propágulos de hongos ectomicorrícicos, debida a la ausencia de árboles durante los últimos años en la zona de recolección, donde se realizaban actividades de pastoreo. Según estos resultados, la presencia de bosques de *F. sylvatica* y plantaciones de *P. menziesii* en los alrededores de la zona de recolección, no constituiría una fuente efectiva de esporas de hongos ectomicorrícicos, a pesar de que la recolección del suelo se realizó a finales de otoño tras la fructificación de los esporocarpos.

Las predicciones sobre infectividad son complejas y deben realizarse con precaución, ya que las condiciones de ensayo pretenden realizar una aproximación a una situación real muy distinta. La recolección y transporte del suelo modifica su estructura y puede alterar la viabilidad de los propágulos fúngicos y de otros microorganismos del suelo. No obstante, en condiciones reales de plantación, la alteración de los horizontes del suelo es una práctica habitual durante la preparación del terreno. Igualmente, la época de realización del ensayo puede influir tanto en la densidad y viabilidad de propágulos en el suelo, como en la receptividad de la planta a la micorrización. Es también necesario considerar todos los factores climáticos que pueden influir en la viabilidad de una determinada comunidad de hongos ectomicorrícicos. Consecuentemente, la verificación posterior en condiciones de campo debe determinar la fiabilidad de este método de detección de hongos ectomicorrícicos nativos, con el objetivo final de poder esclarecer la necesidad de realizar la repoblación con plantas previamente inoculadas en vivero.

Ensayos de receptividad de suelos

Los resultados obtenidos en los ensayos de receptividad de suelos han mostrado diferencias en el comportamiento de los hongos introducidos en función de la especie, la intensidad de micorrización inicial y el tipo de suelo

de trasplante. El crecimiento radicular se ha producido de forma similar en todos los suelos probados, por lo que la variación del porcentaje inicial de micorrización ha constituido un buen indicador de la presencia del hongo.

La cepa S-238 de *L. bicolor* (previamente identificada como *L. laccata* y reclasificada por Armstrong et al. (1989)) ha mostrado una elevada capacidad competitiva en todos los suelos probados. En ensayos precedentes con abetos de Douglas inoculados con la misma cepa en Francia, se observó la colonización de nuevas raíces y una reducción de las micorrizas formadas por hongos nativos en plantación (Villeneuve et al. 1991). Resultados similares se obtuvieron en plantaciones canadienses de *Pinus banksiana* inoculados con otra cepa de *L. bicolor* (McAfee y Fortin 1986). Sin embargo, en plantaciones de abeto de Douglas norteamericanas se ha observado un desplazamiento de *L. proxima* y *L. laccata* por hongos nativos (Danielson 1988; Bledsoe et al. 1982). La elevada competitividad de *L. bicolor* frente a otras cepas de *Laccaria* nativas en plantaciones de abeto de Douglas europeas, podría deberse a la ausencia de hongos competidores de la cepa americana que hayan podido evolucionar conjuntamente (Villeneuve et al. 1991).

La micorrización inicial de *L. bicolor* en plantas inoculadas con inóculo vegetativo fue considerablemente baja (entre el 25 y 30% de raíces cortas micorrizadas), aumentando posteriormente de forma significativa después del trasplante a todos los suelos probados. Marx (1980) estableció para *Pisolithus tinctorius* un umbral de micorrización del 50% a partir del cual se obtiene una mejora significativa de la supervivencia y crecimiento de las plantas inoculadas, en comparación con las no inoculadas, en plantación. En el caso de *L. bicolor*, la rápida colonización del sistema radicular permitiría sobrepasar este umbral mínimo incluso partiendo de bajos porcentajes de micorrización iniciales y en presencia de una elevada presión competitiva. Igualmente, es de destacar la práctica ausencia de micorrizas nativas, incluso en suelos con una densidad de propágulos infectivos elevada. Este hecho

podría explicarse por la capacidad competitiva de *L. bicolor* que impediría el establecimiento de otros hongos.

El tipo de suelo condicionó la persistencia de las micorrizas formadas por *R. subareolatus*. Las plantas micorrizadas con esta especie, mantuvieron o aumentaron el porcentaje inicial de micorrizas en los suelos de Plantación y Douglas. En los suelos de Hayedo y Euskadi, el porcentaje inicial de micorrizas de *R. subareolatus* descendió significativamente, siendo sustituidas por micorrizas nativas en el suelo de Hayedo. Experiencias previas con plantas de abeto de Douglas inoculadas con *R. vinicolor*, indicaron que las micorrizas se mantenían tras dos años de plantación, a pesar de la presencia de hongos micorrícicos nativos (Castellano y Trappe 1985). La intensidad de colonización inicial de *R. subareolatus* resultó indiferente en los suelos no receptivos, aunque el incremento del porcentaje de micorrización final en plantas con un porcentaje de micorrizas inicial inferior al 50% no resultó significativo en el suelo de Douglas. Los resultados obtenidos en este suelo coinciden con los obtenidos por Garbaye (1983) en los que se observó que la intensidad de micorrización inicial condicionaba la colonización posterior de las raíces cortas en plantaciones experimentales.

Los porcentajes finales de micorrización obtenidos para *M. ambiguus* y *T. maculatum* indican una alta receptividad de los tres suelos probados para esta especie, ya que el elevado porcentaje de micorrización inicial se mantuvo sin diferencias significativas. Es de destacar la capacidad competitiva de *T. maculatum* en el suelo de Hayedo, ya que se mantuvo un elevado porcentaje de esta especie de hongo y no se detectó ninguna micorriza nativa.

Los resultados de micorrización final obtenidos en las plantas con inoculaciones dobles de *L. bicolor* + *R. subareolatus*, apoyan la hipótesis formulada en el capítulo 3, donde se postulaba una mayor flexibilidad adaptativa de las plantas con dos hongos simbioses en el sistema radicular. La elevada competitividad de *L. bicolor* permitió la predominancia de esta especie y el desplazamiento de *R. subareolatus* en los suelos de Plantación

y Hayedo. Por el contrario, *R. subareolatus* se mostró más competitivo en el suelo de Douglas y desplazó a *L. bicolor*. Según estos resultados, parece que la tendencia de colonización radicular en las plantas con los dos hongos simbiotes utilizados se decanta hacia la micorrización mono-específica. Los resultados obtenidos por otros autores con *Pinus radiata* inoculado con una mezcla de esporas de *Rhizopogon rubescens*, *R. luteolus* y *L. laccata* manifestaron una tendencia al mantenimiento de los tres hongos en el sistema radicular en proporciones similares (Chu-Chou y Grace 1985). Sin embargo, estos resultados son difícilmente comparables a los obtenidos en este ensayo, ya que se utilizó un substrato semiartificial y una especie arbórea distinta.

Las micorrizas formadas por hongos nativos con micorrizas morfológicamente similares a las formadas por *Laccaria*, *Rhizopogon* y *Tuber* (Tabla 4.(d)), no han podido ser distinguidas de las micorrizas formadas por especies de los mismos géneros utilizadas en los experimentos. Sin embargo, su presencia ha constituido una proporción siempre menor al 10% del total de micorrizas nativas detectadas en los ensayos de infectividad, por lo que su efecto en los resultados no se ha considerado como significativo.

Parámetros de crecimiento

El efecto de la inoculación con distintos hongos ectomicorrícicos sobre los parámetros de crecimiento de las plantas ha podido ser constatado para determinados tratamientos, aunque el corto intervalo de tiempo considerado hace difícil su interpretación. El crecimiento de las plantas, inoculadas y no inoculadas, fue mayor en los suelos de Plantación y Douglas. Este efecto es probablemente debido a la elevada concentración de fósforo asimilable presente en estos suelos (probablemente por su historial agrícola), en comparación con los suelos de Hayedo y Euskadi.

Los parámetros de crecimiento en diámetro basal y volumen de las plantas, se consideran buenos indicadores de su respuesta a un determinado tratamiento de inoculación. Estos parámetros se correlacionan con la biomasa total y su medición no implica la destrucción de la planta, por lo que han sido frecuentemente utilizados en la medición de plantaciones experimentales (Marx et al. 1991). La inoculación con *T. maculatum* ha resultado, en general, detrimental para el crecimiento en diámetro y volumen de las plantas, a pesar de que en determinados suelos las plantas mantuvieron un porcentaje de micorrización elevado. Los resultados obtenidos con este hongo no implican necesariamente su falta de eficacia en la estimulación del crecimiento, ya que la manifestación del efecto de la inoculación con un hongo ectomicorrízico sobre el crecimiento de la planta puede expresarse tras un período de tiempo más o menos largo en plantación, e incluso después de una fase de crecimiento más lenta que la de plantas no inoculadas (Stenström et al. 1985).

Todos los hongos que tuvieron un efecto significativo en el incremento de algún parámetro de crecimiento, mostraron simultáneamente un porcentaje de micorrización final superior al 50%, independientemente del porcentaje de micorrización inicial. El mayor crecimiento de las plantas con porcentajes de micorrización elevados de determinados hongos, en relación con las plantas colonizadas en porcentajes menores, coincide con la observación de Marx (1980) sobre la existencia de valores umbrales de micorrización en *Pisolithus tinctorius* para inducir efectos significativos en el crecimiento.

El análisis global de estos resultados debe interpretarse en el contexto de la artificialidad de las condiciones experimentales. Sin embargo, pueden realizarse determinadas extrapolaciones que pueden resultar de utilidad en la predicción del comportamiento de determinados hongos en plantación que constituye el objetivo de este ensayo. Este método ha resultado suficientemente sensible para detectar la capacidad competitiva de la cepa S-238 de *L. bicolor*, previamente observada en plantación por Le Tacon et al. (1991) y su efecto en la estimulación del crecimiento del abeto de Douglas

que había sido previamente descrito en plantación por Le Tacon et al. (1988) y Villeneuve et al. (1991). Igualmente, se ha detectado la efectividad de *R. subareolatus* en la estimulación del crecimiento en altura de las plantas en determinados suelos. Igualmente, la desaparición de esta especie en el suelo de Hayedo ha resultado detrimental para el crecimiento en altura de las plantas inoculadas. Estos resultados apoyan la sugerencia de Kropp y Langlois (1990) sobre los posibles efectos perjudiciales de determinados hongos no adaptados al suelo de trasplante durante la fase inicial de su desplazamiento por los hongos nativos. Aunque no se dispone de información concreta para *R. subareolatus*, ensayos previos con *R. vinicolor* (igualmente específico de abeto de Douglas), demostraron que el crecimiento en plantación de plantas de abeto de Douglas inoculadas con este hongo resultó superior al de plantas no inoculadas (Castellano y Trappe 1985).

Los resultados obtenidos han mostrado las diferencias de receptividad de distintos suelos a los hongos introducidos. Igualmente, se ha comprobado que el mantenimiento o sustitución de un hongo ectomicorrícico en las condiciones del ensayo puede detectarse en un intervalo de tiempo corto. Los estudios complementarios con otros objetivos, como la detección de los factores concretos que determinan la receptividad (que podrían incluir ensayos con suelos esterilizados como tratamiento) y las comparaciones de los resultados experimentales con los obtenidos en plantaciones, son los puntos que constituyen la investigación futura en este campo a medio y largo plazo.

5. CONCLUSIONES GENERALES

1.- Se ha probado por primera vez la capacidad formadora de micorrizas con abeto de Douglas de 16 especies de hongos que fueron recolectados en asociación con un amplio rango de especies arbóreas, indicando la capacidad infectiva de la flora micorrícica nativa a la especie introducida.

2.- El aislamiento de hongos en cultivo puro a partir de esporocarpos recolectados en las plantaciones estudiadas, ha permitido la selección por su capacidad de formación de ectomicorrizas *in vitro*. Mediante este proceso, se han obtenido un total de 32 cepas en 24 especies de hongos micorrícicos con abeto de Douglas. Entre los hongos que han mostrado una mayor capacidad micorrícica se encuentran especies de *Amanita*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lyophyllum*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* y *Suillus*. La elevada variabilidad intraespecífica observada, indica que la selección debe realizarse a nivel de cepa.

3.- La utilización de inóculo vegetativo ha resultado efectiva únicamente en 4 de las 13 cepas de hongos micorrícicos probadas para la formación de ectomicorrizas de abeto de Douglas producido en contenedor. Los estudios de dosis óptima de aplicación, críticos para reducir los costos de producción, permiten destacar la efectividad de *Laccaria bicolor* y *Hebeloma sinapizans* a bajas dosis de inóculo. La falta de efectividad de los géneros *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon* y *Suillus* puede deberse a su sensibilidad a la manipulación que conlleva la aplicación de este tipo de inóculo.

4.- La producción de inóculo mediante la inclusión de micelio en gel de alginato ha mostrado que determinados hongos no son tolerantes a concentraciones elevadas de CaCl_2 utilizadas en la polimerización, ni al almacenamiento en frío. Este tipo de inóculo ha sido probado por primera vez en la producción de planta en contenedor con tres especies de hongos y ha resultado efectivo en la formación de ectomicorrizas de *Laccaria bicolor*, incluso a bajas dosis de aplicación.

5.- La inoculación con esporas ha resultado efectiva en 5 de las 9 especies de hongos probadas. La capacidad formadora de micorrizas con abeto de Douglas ha sido descrita por primera vez para todas las especies que resultaron efectivas excepto *Pisolithus tinctorius*. Los ensayos de dosis permiten destacar la capacidad micorrícica de *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon subareolatus* y *Tuber maculatum*. La elevada producción de esporas de las dos primeras especies hacen viable la utilización comercial en vivero de este tipo de inóculo una vez comprobada su eficacia en campo.

6.- Las inoculaciones dobles realizadas *in vitro*, han mostrado diferencias entre los distintos hongos probados en su capacidad colonizadora relativa del sistema radicular y en la inducción de la formación de raíces cortas. Los hongos más competitivos han sido *Laccaria bicolor* y *Rhizopogon subareolatus*. Se ha probado que la coexistencia de distintas especies de hongos en el mismo sistema radicular puede obtenerse modificando las concentraciones iniciales de inóculo para cada hongo. La realización de inoculaciones dobles en abeto de Douglas producido en contenedor en invernadero, ha dado como resultado una proporción variable de plantas con los dos hongos simbioses coexistiendo en el mismo sistema radicular. La combinación óptima de *Rhizopogon subareolatus* y *Laccaria bicolor* produjo un 45% de plantas con los dos tipos de micorrizas, mientras que en la combinación de *R. subareolatus* y *Melanogaster ambiguus* se obtuvo un 35% de plantas con micorrizas de ámbas especies.

7.- Los bioensayos de infectividad y receptividad de suelos en contenedor detectaron una menor abundancia y diversidad de hongos simbioses en zonas previamente deforestadas respecto a zonas forestadas. La persistencia de las micorrizas en las condiciones probadas depende de la combinación hongo-suelo y del porcentaje inicial de micorrizas de las plantas. Las plantas con inoculaciones dobles han mostrado una alternancia en la persistencia de un determinado hongo según el suelo probado que demuestra su mayor adaptabilidad respecto a las plantas inoculadas con una sola especie de hongo simbiote.

6. REFERENCIAS

- Abreu, J.M.De. 1990. Incorporación de las tierras marginales al sector forestal. *Ecología, Fuera de Serie 1*: 275-289.
- Abuzinadah, R.A. y D.J. Read. 1988. Aminoacids as nitrogen sources for ectomycorrhizal fungi: utilization of individual aminoacids. *Trans. Br. mycol. Soc.* 91: 473-479.
- Acsai, J. y D.L. Largent. 1983. Ectomycorrhizae of selected conifers growing in sites which support dense growth of bracken fern. *Mycotaxon* 16: 509-518.
- Almansa, A. 1990. Producción y consumo de productos forestales en España. *Ecología, Fuera de Serie 1*: 239-256.
- Alvarez, I.F. y J.M. Trappe. 1983a. Effects of application rate and cold soaking pretreatment of *Pisolithus* basidiospores on effectiveness as nursery inoculum on western conifers. *Can. J. Forest Res.* 13: 533-537.
- Alvarez, I.F. y J.M. Trappe. 1983b. Dusting roots of *Abies concolor* and other conifers with *Pisolithus tinctorius* spores at outplanting time proves ineffective. *Can. J. For. Res.* 13: 533-537.
- Alvarez, I.F., J. Parladé y J.M. Trappe. 1992. Hypogeous mycorrhizal fungi of Spain. En preparación.
- Ammirati, J. 1979. Chemical studies of mushrooms: the need for voucher collections. *Mycologia* 71: 437-441.
- Arbez, M. 1987. Les ressources génétiques forestières en France. Tome 1: Les conifères. I.N.R.A. Paris. 236 pp.
- Armson, K.A. y V. Sadrieka. 1974. Forest tree nursery soil management and related practices. *Ont. Minist. Nat. Resour., Ont., Can.* 143 pp.
- Armstrong, J.L., N.L. Fowles y P.T. Rygiewicz. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 116: 1-7.
- Azevedo, N. 1982. Ectomicorrizas del *Pinus pinaster* Sol. ex Ait. *Bol. Estac. Cent. Ecol.* 22: 37-42.
- Barnett, J.P. 1974. Growing containerized southern pines. En: *Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedling Symp.*, R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council. Publ. 68. Denver, CO. pp. 124-128.
- Ben Salem, B. 1971. Root strangulation- A neglected factor in container grown nursery stock. M.S. Thesis. Univ. of Calif., Berkeley, CA. 50 pp.
- Benecke, U. y F. Göbl. 1974. The influence of different mycorrhizae on growth, nutrition and gas-exchange of *Pinus mugo* seedlings. *Plant Soil* 40: 21-32.
- Berry, C.R. y D.H. Marx. 1978. Effects of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on growth of loblolly and Virginia pine in the Tennessee Copper Basin. *USDA Forest Serv. Res. Note SE-264*.
- Blaschke, H. y W. Bäuml. 1989. Mycophagy and spore dispersal by small mammals in Bavarian forests. *For. Ecol. Manage.* 26: 237-245.
- Bledsoe, C.S. y R.J. Zasoski. 1983. Effects of ammonium and nitrate on growth and nitrogen uptake by mycorrhizal Douglas-fir seedlings. *Plant Soil* 71: 445-454.
- Bledsoe, C.S., K. Tennyson y W. Lopushinsky. 1982. Survival and growth of outplanted Douglas-fir seedlings inoculated with mycorrhizal fungi. *Can. J. For. Res.* 12: 720-723.
- Bohmont, B.L. 1983. The new pesticide user's guide. Reston Publishing Co., Reston, VA, 452 pp.
- Bollen, W.B. 1969. Properties of tree barks in relation to their agricultural utilization. *USDA Forest Serv. Res. Pap. PNW-77*. Pacific Northwest Forest and Range Experimental Station, Portland, OR. 36 pp.
- Bonneau, M. 1972. Contribution a l'étude de la nutrition et de la fertilisation des plantations d'*Epicéa* dans le Massif Central. *Ann. Sci. For.* 29: 3-34.
- Boulay, M. 1979. Propagation *in vitro* du Douglas par micropropagation de germination aseptique et culture de

- bourgeons dormants. *En*: Micropropagation des Arbres Forestiers. Ann. AFOCEL (Assoc. For.-cellul.), 6/79 (12): 67-75.
- Bowen, G.D. 1965. Mycorrhiza inoculation in forestry practices. *Aust. For.* 29: 231-237.
- Bowen, G.D. 1973. Mineral nutrition in ectomycorrhizae. *En*: Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press, New York. pp. 151-197.
- Bowen, G.D. 1980. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. *En*: Tropical mycorrhiza research. P. Mikola (ed.). Oxford University Press, Oxford. pp. 165-190.
- Bowen, G.D. y C. Theodorou. 1967. Studies on phosphate uptake by mycorrhizas. *En*: Proc. 14th Congress of the International Union of Forest Research Organizations, Part V, Sect. 24. Munich. pp. 116-138.
- Bowen, G.D. y C. Theodorou. 1979. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 11: 119-126.
- Briscoe, C.B. 1959. Early results of mycorrhizal inoculation of pine in Puerto Rico. *Caribb. For.* 20: 73-77.
- Brix, H. y R. van den Driessche. 1974. Mineral nutrition of container-grown tree seedlings. *En*: Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedling Symp., R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council. Publ. 68. Denver, CO. pp. 77-84.
- Brownlee, C., J.A. Duddridge, A. Malibari y J. Read. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant Soil* 71: 433-444.
- Burdsall, H.H., Jr., J.S. MacFall y M.A. Albers. 1986. *Hebeloma arenosa* (Agaricales, Cortinariaceae), a new species from Lake States nurseries. *Mycologia* 78: 862-865.
- Castellano, M.A., y J.M. Trappe. 1985. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas-fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. *Can. J. For. Res.* 15: 613-617.
- Castellano, M.A., J.M. Trappe y R. Molina. 1985. Inoculation of container-grown Douglas-fir with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. *Can. J. For. Res.* 15: 10-13.
- Castellano, M.A., J.M. Trappe, Z. Maser y C. Maser. 1989. Key to spores of the genera of hypogeous fungi of north temperate forests with reference to animal mycophagy. Mad River Press, Eureka, CA. 186 pp.
- C.E.E. 1984. La couverture verte de l'Europe. Nos forêts d'aujourd'hui et de demain. Bruselas. 24 pp.
- Cheng, T-Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Sci. Lett.* 5: 97-102.
- Cheng, T-Y. 1978. Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. *Comb. Proc. Int. Plant Propag. Soc.* 28: 139-155.
- Cheng, T-Y. y T.H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. *Science* 198: 306-307.
- Chilvers, G.A. 1968. Some distinct types of eucalypt mycorrhizas. *Aust. J. Bot.* 16: 49-70.
- Chu-Chou, M. 1979. Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 11: 557-562.
- Chu-Chou, M. y L.J. Grace. 1981. Mycorrhizal fungi of *Pseudotsuga menziesii* in the north island of New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 13: 247-249.
- Chu-Chou, M. y L.J. Grace. 1983. Characterization and identification of mycorrhizas of Douglas-fir in New Zealand. *Eur. J. For. Path.* 13: 251-260.
- Chu-Chou, M. y L.J. Grace. 1985. Comparative efficiency of the mycorrhizal fungi *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon* species on growth of radiata pine seedlings. *N. Z. J. Bot.* 23: 417-424.
- Clement, A., J. Garbaye y F. Le Tacon. 1977. Importance des ectomycorhizes dans la résistance au calcaire du Pin noir (*Pinus nigra* Arn. ssp. *nigricans* Host). *Oecol. Plant.* 12: 111-131.
- Copes, D.L. 1973. Inheritance of graft incompatibility in Douglas-fir. *Bot. Gaz.* 134: 49-52.
- Copes, D.L. 1974. Genetics of graft rejection in

- Douglas-fir. Can. J. For. Res. 4: 186-192.
- Cromack, K., P. Sollins, W.C. Graustein, K. Seidel, A.W. Todd, G. Spycher, Y.L. Ching y R.L. Todd. 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. Soil Biol. Biochem. 11: 463-468.
- Crowley, D.E., D.M. Maronek y J.W. Hendrix. 1986. Inoculum banding, inoculum age and fertilization rate in relation to production of container-grown shortleaf pine seedlings mycorrhizal with *Pisolithus tinctorius*. Sci. Hortic. (Amst.) 29: 387-394.
- Daft, M.J. 1983. The influence of mixed inocula on endomycorrhizal development. Plant Soil 71: 331-337.
- Danielson, R.M. 1988. Mycorrhizae in forestry: the state of the art in land reclamation. En: Proceedings of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry, May 1-4, 1988. M. Lalonde y Y. Piché (eds.). Centre de Recherche en Biologie Forestière, Faculté de Foresterie et de Géodésie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec. pp. 49-51.
- Danielson, R.M. y S. Visser. 1990. The mycorrhizal and nodulation status of container-grown trees and shrubs reared in commercial nurseries. Can. J. For. Res. 20: 609-614.
- Danielson, R.M., S. Visser y D. Parkinson. 1984. Production of ectomycorrhizae on container-grown jack pine seedlings. Can. J. For. Res. 14: 33-36.
- De Oliveira, V.L. 1988. Interactions entre les microorganismes du sol et l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne chez le hêtre avec *Hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus*. Thèse de l'Université de Nancy, 118 pp.
- De Oliveira, V.L. y J. Garbaye. 1989. Les microorganismes auxiliaires de l'établissement des symbioses mycorrhiziennes. Eur. J. For. Pathol. 19: 54-64.
- Dighton, J. 1987. Ecology and management of ectomycorrhizal fungi in UK. En: Mycorrhizae in the Next Decade: Practical Applications and Research Priorities. D.M. Sylvia, L.L. Hung y J.H. Graham (eds.). Seventh North American Conference on Mycorrhizae, May 3-8, 1987. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL. pp. 75-78.
- Dighton, J. y P.A. Mason. 1985. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. En: Developmental biology of higher fungi. D. Moore, L.A. Casselton, D.A. Wood y J.C. Frankland (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 117-139.
- Dixon, R.K. 1986. Ectomycorrhizal fungi: Prescription for improving survival and growth of high quality trees. American Christmas Tree Journal 30: 52-54.
- Dixon, R.K., S.G. Pallardy, H.E. Garrett, G.S. Cox y I.L. Sander. 1983. Comparative water relations of container-grown and bare-root ectomycorrhizal and nonmycorrhizal *Quercus velutina* seedlings. Can. J. Bot. 61: 1559-1565.
- Dixon, R.K., H.E. Garrett, G.S. Cox, D.H. Marx y I.L. Sander. 1984. Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. I. Inoculation success and seedling growth relationships. For. Sci. 30: 364-372.
- Dixon, R.K., G.T. Behrens, H.E. Garrett, G.S. Cox y I.L. Sander. 1985. Synthesis of ectomycorrhizae on container-grown oak seedlings. South. J. Appl. For. 9: 95-99.
- Dominik, T. 1969. Key to ectotrophic mycorrhizae. Folia For. Polonica Ser. A. 15: 309-328.
- Donald, D.G.M. 1975. Mycorrhizal inoculation for pines. S. Afr. For. J. 92: 27-29.
- Duddridge, J.A., A. Malbari y D.J. Read. 1980. Structure and functions of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. Nature 287: 834-836.
- Duponnois, R. y J. Garbaye. 1991. Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions. Ann. Sci. For. 48: 239-251.
- Duryea, M.L. y T.D. Landis (eds.). 1984. Forest nursery manual production of bareroot seedlings. Martinus Nijhoff Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster. 386 pp.
- Duvert, P. 1987. Réceptivité des sols aux associations mycorrhiziennes et aptitude prophylactique des mycorrhizes. Thèse de l'Université de Dijon, 195 pp.
- Ekwebelam, S.A. y C.P.P. Reid. 1983. Effect of

- light, nitrogen fertilization, and mycorrhizal fungi on growth and photosynthesis of lodgepole pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 13: 1099-1106.
- Fassi, B. y M. Palenzona. 1969. Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus*, *Pseudotsuga menziesii* ed *Endogone lactiflua*. *Allionia* 15: 105-114.
- Finlay, R.D. y D.J. Read. 1986a. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of ¹⁴C-labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytol.* 103: 143-156.
- Finlay, R.D. y D.J. Read. 1986b. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytol.* 103: 157-165.
- Fleming, L.V. 1985. Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on birch (*Betula* sp.) seedling root systems. *Soil Biol. Biochem.* 17: 591-600.
- Fogel, R. 1980. Mycorrhizae and nutrient cycling in natural forest ecosystems. *New Phytol.* 86: 199-212.
- Fogel, R. y J.M. Trappe. 1978. Fungus consumption (mycophagy) by small animals. *N.W. Sci.* 52: 1-31.
- Fontana, A. 1967. Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. *Giorn. Bot. Ital.* 101: 298-299.
- Forster, S.M. 1979. Microbial aggregation of sand in an embryo dune system. *Soil Biol. Biochem.* 11: 537-541.
- France, R.C. y M.L. Cline. 1987. Growth response of five Rocky Mountain conifers to different ectomycorrhizal inocula. *Tree Plant. Notes* 38: 18-21.
- Francllet, A. 1980. Rejeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. *AFOCEL. Etudes et Recherches* 12:3-19.
- Frank, A.B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. Deut. Bot. Gesell.* 3: 128-145.
- Fries, N. 1978. Basidiospore germination in mycorrhiza-forming hymenomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70: 319-324.
- Fries, N. 1981. Recognition reactions between basidiospores and hyphae in *Leccinum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77: 9-14.
- Fries, N. y D. Birraux. 1980. Spore germination in *Hebeloma* stimulated by living plant roots. *Experientia* 36: 1057-1057.
- Froidevaux, L. 1975. Identification of some Douglas-fir mycorrhizae. *Eur. J. For. Path.* 5: 212-216.
- Gadgil, P.D. y J.M. Harris (eds.). 1980. Planting stock quality. *N.Z.J. For. Sci.* 10: 305.
- Garbaye, J. 1983. Premiers résultats de recherches sur la compétitivité des champignons ectomycorhiziens. *Plant Soil* 71: 303-308.
- Garbaye, J. 1984. Compétitivité des champignons ectomycorhiziens. *Rev. For. Fr.* 36: 33-43.
- Garbaye, J. y G.D. Bowen. 1987. Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.* 17: 941-943.
- Garbaye, J., J.C. Delwaulle y D. Diangana. 1988. Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *For. Ecol. Manage.* 24: 151-157.
- Garbaye, J., R. Duponnois y J.L. Wahl. 1990. The bacteria associated with *Laccaria laccata* ectomycorrhizas or sporocarps: effect on symbiosis establishment on Douglas-fir. *Symbiosis* 9: 267-273.
- Gay, G., R. Rouillon y G. Bruchet. 1985. Rôle des substances libérées par les champignons ectomycorhiziens dans la morphogenèse des systèmes racinaires. *En: Les Mycorhizes: biologie et utilisation*, Dijon, 5-6 mai, éd. INRA. Publ. (les colloques de l'INRA, n° 13), 163-177.
- Girbal, J. 1986. Fongs del Montseny. *En: El Patrimoni biològic del Montseny. Catàlegs de flora i fauna*. I. J. Terradas y J. Miralles (eds.). Diputació de Barcelona. Servei de Parcs Naturals. Barcelona. 155 pp.
- Gobierno Vasco. 1988. Inventario Forestal 1986. Depto. Agric. y Pesca C.A.P.V.
- Godbout, C. y J.A. Fortin. 1985. Synthesized ectomycorrhizae of aspen: fungal genus level of structural characterization. *Can. J.*

- Bot. 63: 252-262.
- Gogala, N. 1971. Growth substances in mycorrhiza of the fungus *Boletus pinicola* Vitt. and the pine-tree *Pinus sylvestris* L., Dissertation, cl. IV, Akad. Sci. Art., Slovenica, 123-202.
- Gölb, F. 1975. Esfahrungen bei der Anzucht von Mykorrhiza Impfmateral. Centralbl. Gesamte Forstwes. 92: 227-237.
- Graham, J.H. y R.G. Linderman. 1980. Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium*-infected Douglas-fir roots. Can. J. Microbiol. 26: 1340-1347.
- Grogan, H. y D.T. Mitchell. 1990. The mycorrhizal status of some forest sites and the propagation of ectomycorrhizal Sitka spruce seedlings in Ireland. Aspects Appl. Biol. 24: 123-130.
- Hacskaylo, E. 1953. Pure culture synthesis of pine mycorrhizae in terra-lite. Mycologia 45: 971-975.
- Hacskaylo, E. 1971. Metabolite exchanges in ectomycorrhizae. En: Mycorrhizae. E. Hacskaylo (ed.). USDA Forest Serv. Misc. Publ. N° 1189, pp. 175-182.
- Hacskaylo, E. y J.A. Vozzo. 1967. Inoculation of *Pinus caribaea* with pure cultures of mycorrhizal fungi in Puerto Rico. En: Proc. 14th Int. Union Forest. Res. Organ. Munich. Vol. 5: 139-148.
- Harley, J.L. 1969. A physiologist's viewpoint. En: Ecological Aspects of Mineral Nutrition of Plants. J. Rorison (ed.). Blackwell, Oxford. pp. 437-447.
- Harley, J.L. 1973. Symbiosis in the ecosystem. J. Nat. Sci. Council Sri Lanka 1: 31-48.
- Harley, J.L. y S.E. Smith. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London. 483 pp.
- Harley, J.L. y J.M. Wilson. 1959. The absorption of potassium by beech mycorrhizas. New Phytol. 58: 281-298.
- Harvey, A.E., M.F. Jurgensen y M.J. Larsen. 1980. Clearcut harvesting and ectomycorrhizae: survival of activity on residual roots and influence on bordering forest stand in western Montana. Can. J. For. Res. 10: 300-303.
- Hellum, A.K. 1975. Selecting peat for rearing coniferous container seedlings. For. Chron. 51: 200-202.
- Heninger, R.L. y D.P. White. 1974. Tree seedling growth at different soil temperatures. For. Sci. 20: 363-367.
- Hermann, R.K. 1977. Growth and production of tree roots. En: The belowground ecosystem: a synthesis of plant-associated processes. J.K. Marshall (ed.). Colorado State University, Fort Collins, CO. pp. 7-28.
- Hermann, R.K. 1987. North American tree species in Europe. Journal of Forestry. Dec. 1987, pp. 27-32.
- Hiatt, H.A. y R.W. Tinus. 1974. Container shape controls root system configuration of ponderosa pine. En: Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedling Symp. R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council. Publ. 68. Denver, CO. pp. 194-196.
- Ho, I. 1987. Enzymes and growth substances of *Rhizopogon* species in relation to mycorrhizal hosts and infrageneric taxonomy. Mycologia 79: 553-558.
- Ho, I. y J.M. Trappe. 1980. Nitrate reductase activity of non-mycorrhizal Douglas-fir rootlets and of some associated mycorrhizal fungi. Plant Soil 54: 395-398.
- Ho, I. y J.M. Trappe. 1987. Enzymes and growth substances of *Rhizopogon* species in relation to mycorrhizal hosts and infrageneric taxonomy. Mycologia 79: 553-558.
- Hung, L.L. 1984. Ectomycorrhizal inoculation of Douglas-fir nursery stock with commercially prepared inoculum. Ph.D. thesis. Oregon State University, Corvallis, OR. 103 pp.
- Hung, L.L. y R. Molina. 1986a. Temperature and time in storage influence the efficacy of selected isolates of fungi in commercially produced ectomycorrhizal inoculum. For. Sci. 32: 534-545.
- Hung, L.L. y R. Molina. 1986b. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. III. Effects of commercially produced inoculum on container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. Can. J. For. Res. 16: 802-806.
- Hung, L.L. y J.M. Trappe. 1983. Growth variation between and within species of

- ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia* 75: 234-241.
- Hung, L.L. y J.M. Trappe. 1987. Ectomycorrhizal inoculation of Douglas-fir transplanted container seedlings with commercially produced inoculum. *New Forests* 1: 141-152.
- Hunt, G.A. y J.M. Trappe. 1987. Seasonal hypogeous sporocarp production in a western Oregon Douglas-fir stand. *Can. J. Bot.* 65: 438-445.
- Ivory, M.H. y F.M. Munga. 1983. Growth and survival of container-grown *Pinus caribaea* infected with various ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 71: 339-344.
- Jansen, A.E. y H.W. De Nie. 1988. Relations between mycorrhizas and fruitbodies of mycorrhizal fungi in Douglas-fir plantations in The Netherlands. *Acta Bot. Neerl.* 37: 243-249.
- Kendrick, B. 1988. Recommendations of steering committee. *En: Proceedings of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry, May 1-4, 1988.* M. Lalonde y Y. Piché (eds.), Centre de Recherche en Biologie Forestière, Faculté de foresterie et de géodésie, Université Laval, Sainte-Foy (Québec).
- Kottke, I. y F. Oberwinkler. 1986. Mycorrhiza of forest trees - structure and function. *Trees* 1: 1-24.
- Kropp, B.R. 1982. Formation of mycorrhizae on nonmycorrhizal western hemlock outplanted on rotten wood and mineral soil. *For. Sci.* 28: 706-710.
- Kropp, B.R. y C. G. Langlois. 1990. Ectomycorrhizae in reforestation. *Can. J. For. Res.* 20: 438-451.
- Krueger, K.W. y R.H. Ruth. 1969. Comparative photosynthesis of red alder, Douglas-fir, Sitka spruce, and western hemlock seedlings. *Can. J. Bot.* 47: 519-527.
- Laiho, O. 1965. Further studies on ectendotrophic mycorrhiza. *Acta For. Fenn.* 79: 1-35.
- Laiho, O. 1970. *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta For. Fenn.* 106: 1-72.
- Lamb, R.J. y B.N. Richards. 1974a. Survival potential of sexual and asexual spores of ectomycorrhizal fungi. *Trans. Br. mycol. Soc.* 62: 181-191.
- Lamb, R.J. y B.N. Richards. 1974b. Inoculation of pines with mycorrhizal fungi in natural soil. I. Effects of density and time of application of inoculum and phosphorus amendment on mycorrhizal infection. *Soil Biol. Biochem.* 6: 167-171.
- Landis, T.D., R.W. Tinus, S.E. McDonald, J.P. Barnett. 1989. *The Biological Component: Nursery Pests and Mycorrhizae, Vol. 5. The Container Tree Nursery Manual.* Agric. Handbk. 674. Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C. 171 pp.
- Lázaro Ibiza, B. 1908. Nuevos tuberáceos de España. *Rev. R. Acad. Cienc. Exactas Fis. Nat. Madr.* 6: 801-826.
- Le Tacon, F. 1982. Perspectives de la maîtrise de la mycorrhization en sylviculture. *En: Les mycorrhizes: biologie et utilisation, Dijon, 5-6 mai, éd. INRA. Publ. (les colloques de l'INRA, n° 13),* 273-285.
- Le Tacon, F. y D. Bouchard. 1986. Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas-fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecol. Oecol. Appl.* 7: 389-402.
- Le Tacon, F. y J. Garbaye. 1986. La maîtrise des associations mycorrhiziennes en pépinière forestière. *Rev. For. Fr.* 38: 249-257.
- Le Tacon, F. y J.M. Valdenaire. 1980. La mycorrhization contrôlée en pépinière. *Rev. For. Fr.* 32: 281-293.
- Le Tacon, F., G. Jung, P. Michelot y M. Mugnier. 1983. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorrhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Ann. Sci. For.* 40: 165-176.
- Le Tacon, F., D. Lamoure, J. Guimberteau y C. Fiket. 1984. Les symbiotes mycorrhiziens de l'épicéa commun et du Douglas dans le Limousin. *Rev. For. Fr.* 36: 325-338.
- Le Tacon, F., G. Jung, J. Mugnier, P. Michelot y C. Mauperin. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.* 63: 1664-1668.
- Le Tacon, F., J. Garbaye, D. Bouchard, G.

- Chevalier, J.M. Olivier, J. Guimberteau, N. Poitou y N. Frochot. 1988. Field results from ectomycorrhizal inoculation in France. *En: Proceedings of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry*. M. Lalonde y Y. Piché (eds.) May 1-4, 1988. Centre de Recherche en Biologie Forestière, Faculté de Foresterie et de Géodésie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec.
- Le Tacon, F., I.F. Alvarez, D. Bouchard, B. Henrion, R.M. Jackson, J. Parladé, J. Pera, E. Stenström, N. Villeneuve y C. Walker. 1991. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. Third European Symposium on Mycorrhizas. Mycorrhizal in Ecosystems - Structure and Function. Sheffield, August 19-23, 1991.
- Levisohn, I. 1956. Growth stimulation of forest tree seedlings by the activity of free-living mycorrhizal mycelia. *Forestry* 29: 53-59.
- Linderman, R.G. 1987. Perspectives on ectomycorrhiza research in the Northwest. *En: Mycorrhizae in the Next Decade: Practical Applications and Research Priorities*. Seventh north American Conference on Mycorrhizae, May 3-8, 1987. D.M. Sylvia, L.L. Hung y J.H. Graham (eds.). Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL. pp. 72-74.
- Linderman, R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Littke, W.R., C.S. Bledsoe y R.L. Edmonds. 1984. Nitrogen uptake and growth *in vitro* by *Hebeloma crustuliniforme* and other Pacific Northwest mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 62: 647-652.
- Littke, W.R., C.S. Bledsoe, M. Nadkarni y R.L. Edmonds. 1980. Technique for rapid mycorrhizal colonization of container-grown Douglas-fir by *Hebeloma crustuliniforme*. *Soil Biol. Biochem.* 12: 575-578.
- Luoma, D.L., R.E. Frenkel y J.M. Trappe. 1991. Fruiting of hypogeous fungi in Oregon Douglas-fir forests: seasonal and habitat variation. *Mycologia* 83: 335-353.
- Malajczuk, N. y A.J. McComb. 1977. Root exudates from *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex Sm. and their effect on *Phytophthora cinnamomi*. *Rands. Aust. J. Bot.* 25: 501-514.
- Malajczuk, N. y A.J. McComb. 1979. The microflora of unsterilized roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex Sm. seedlings grown in soils suppressive and conducive to *Phytophthora cinnamomi* Rands. I. Rhizoplane bacteria, actinomycetes and fungi. II. Mycorrhizal roots and associated microflora. *Aust. J. Bot.* 27: 235-272.
- Malajczuk, N., J.M. Trappe y R. Molina. 1987. Interrelationships among some ectomycorrhizal trees, hypogeous fungi and small mammals: Western Australian and northwestern American parallels. *Aust. J. Ecol.* 12: 53-55.
- M.A.P.A. 1988. Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 659 pp.
- Maronek, D.M. y J.W. Hendrix. 1980. Synthesis of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on seedlings of four woody species. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 105: 823-825.
- Maronek, D.M., J.W. Hendrix y C.D. Stevens. 1981. Fertility-mycorrhizal-isolate interactions in production of containerized pin oak seedlings. *Sci. Hortic.* 15: 283-289.
- Maronek, D.M., J.W. Hendrix y P.L. Cornelius. 1982. Slow-release fertilizers optimize mycorrhizal development in container-grown pine seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius*. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 107: 1104-1110.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Marx, D.H. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopathol.* 10: 429-454.
- Marx, D.H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases. *En: Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press. New York. pp. 351-382.
- Marx, D.H. 1976a. Synthesis of ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings with basidiospores of *Pisolithus tinctorius*. *For. Sci.* 22: 13-20.

- Marx, D.H. 1976b. Use of specific mycorrhizal fungi on tree roots for forestation on disturbed lands. *En: Proc. Conf. on Forestation on Disturbed Areas*. K.A. Utz (ed.), Birmingham, Ala., April 14-15, 1976. U.S. Dep. Agric. For. Serv., Atlanta, GA. pp. 47-65.
- Marx, D.H. 1977a. The role of mycorrhizae in forest production. TAPPI Conf. Papers, Ann. Mtg., Atlanta, GA. pp. 151-161.
- Marx, D.H. 1977b. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Microbiol.* 23: 217-233.
- Marx, D.H. 1979. *Pisolithus* ectomycorrhizae survive cold storage on shortleaf pine seedlings. U.S.D.A. For. Ser. Res. Not. SE-281. 4 pp.
- Marx, D.H. 1980. Ectomycorrhiza fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. *En: Tropical mycorrhiza research*. P. Mikola (ed.). Oxford University Press, Oxford. pp. 13-71.
- Marx, D.H. 1981. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. *Can. J. For. Res.* 11: 168-174.
- Marx, D.H. y J.D. Artman. 1979. *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae improve survival and growth of pine seedlings on acid coal spoils in Kentucky and Virginia. *Reclam. & Reveg. Res.* 2: 23-31.
- Marx, D.H. y J.P. Barnett. 1974. Mycorrhizae and containerized forest tree seedlings. *En: Proc. N. Amer. Containerized Forest Tree Seedling Symp.* R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council Publ. Nº 68. Denver, CO. pp. 85-91.
- Marx, D.H. y W. Bell. 1985. Formation of *Pisolithus* ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings with spore pellet inoculum applied at different times. USDA Forestry Service Research Paper SE-249, 6 pp.
- Marx, D.H. y W.C. Bryan. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *For. Sci.* 21: 245-254.
- Marx, D.H. y C.E. Cordell. 1987. Ecology and management of ectomycorrhizal fungi in regenerating forests in the eastern United States. *En: Mycorrhizae in the Next decade: Practical Applications and Research Priorities*. May 3-8, 1987. D.M. Sylvia, L.L. Hung y J.H. Graham (eds.). Seventh North American Conference on Mycorrhizae Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL. pp. 69-71.
- Marx, D.H. y C.E. Cordell. 1988. Specific ectomycorrhizae improve reforestation and reclamation in the eastern United States. *En: Proceedings of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry*. May 1-4, 1988. M. Lalonde y Y. Piché (eds.). Centre de Recherche en Biologie Forestière, Faculté de foresterie et de géodésie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec.
- Marx, D.H. y C.B. Davey. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 59: 549-558.
- Marx, D.H. y G.E. Hatchell. 1986. Root stripping of ectomycorrhizae decreases field performance of loblolly and longleaf pine seedlings. *South. J. Appl. For.* 10: 173-179.
- Marx, D.H. y D.S. Kenney. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. *En: Methods and principles of mycorrhizal research*. N.C. Schenck (ed.). Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. pp. 131-146.
- Marx, D.H. y E.W. Ross. 1970. Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*. *Can. J. Bot.* 48: 197-198.
- Marx, D.H. y S.J. Rowan. 1981. Fungicides influence growth and development of specific ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings. *For. Sci.* 27: 167-176.
- Marx, D.H. y J.L. Ruehle. 1989. Ectomycorrhizae as biological tools in reclamation and revegetation of waste lands. *En: Mycorrhizae for Green Asia*. A. Mahadevan, N. Raman y K. Natarajan (eds.). Proceedings First Asian Conference on Mycorrhizae, 29-31 January 1988, Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras, Guindy Campus, Madras. pp. 336-344.
- Marx, D.H. y B. Zak. 1965. Effect of pH on mycorrhizal formation of slash pine in

- aseptic culture. For. Sci. 11: 66-75.
- Marx, D.H., W.C. Bryan y C.B. Davey. 1970. Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. For. Sci. 16: 424-431.
- Marx, D.H., W.C. Bryan y C.E. Cordell. 1976. Growth and ectomycorrhizal development of pine seedlings in nursery soils infested with the fungal symbiont, *Pisolithus tinctorius*. For. Sci. 22: 91-100.
- Marx, D.H., W.C. Bryan y C.E. Cordell. 1977a. Survival and growth of pine seedlings with *Pisolithus* ectomycorrhizae after two years on reforestation sites in north Carolina and Florida. For. Sci. 23: 263-273.
- Marx, D.H., A.B. Hatch y J.F. Mendicino. 1977b. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. Can. J. Bot. 55: 1569-1574.
- Marx, D.H., W.G. Morris y J.G. Mexal. 1978. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated and nonfumigated soil infested with different fungal symbionts. For. Sci. 24: 193-203.
- Marx, D.H., J.G. Mexal y W.G. Morris. 1979. Inoculation of nursery seedbeds with *Pisolithus tinctorius* spores mixed with hydromulch increases ectomycorrhizae and growth of loblolly pines. South. J. Appl. For. 3: 175-178.
- Marx, D.H., J.L. Ruehle, D.S. Kenney, C.E. Cordell, J.W. Riffle, R.J. Molina, W.H. Pawuk, S. Navratil, R.W. Tinus y O.C. Goodwin. 1982. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. For. Sci. 28: 373-400.
- Marx, D.H., K. Jarl, J.L. Ruehle y W. Bell. 1984a. Development of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on pine seedlings using basidiospore-encapsulated seeds. For. Sci. 30: 897-907.
- Marx, D.H., C.E. Cordell, D.S. Kenney, J.G. Mexal, J.D. Artman, J.W. Riffle y R.J. Molina. 1984b. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. Monograph 25, For. Sci. 30, 101 pp.
- Marx, D.H., C.E. Cordell y A. Clark. 1988. Eight-year performance of loblolly pine with *Pisolithus* ectomycorrhizae on a good-quality forest site. South. J. Appl. For. 12: 275-280.
- Marx, D.H., J.L. Ruehle y C.E. Cordell. 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. En: Methods in Microbiology, Vol. 23. J.R. Norris, D.J. Read y A.K. Varma (eds.). Academic Press. London. pp. 384-411.
- Maser, C., J.M. Trappe y R.A. Nussbaum. 1978. Fungal-small mammal interrelationships with emphasis on Oregon coniferous forests. Ecology 59: 799-809.
- Maser, Z., Maser, C. y J.M. Trappe. 1985. Food habits of the northern flying squirrel *Glaucomys sabrinus* in Oregon. Can. J. Zool. 63: 1085-1088.
- Mason, P.A. 1980. Aseptic synthesis of sheathing (ecto-) mycorrhizas. En: Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. D.S. Ingram y J.P. Helgeson (eds.). pp. 173-178.
- Mason, P.A., J. Wilson, F.T. Last y C. Walker. 1983. The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. Plant Soil 71: 247-256.
- Mason, P.A., F.T. Last y J. Wilson. 1985. Effects of different soils on the establishment and influence of sheathing mycorrhizas. En: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, July 1-5, 1985, Dijon. V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi (eds.). INRA, Paris.
- Matthews, J.D. 1983. The role of north-west American trees in western Europe. H.R. MacMillan Lectureship in Forestry. Univ. B.C., Vancouver. 24 pp.
- Mauperin, C. F. Mortier, J. Garbaye, F. Le Tacon y G. Carr. 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. Can. J. Bot. 65: 2326-2329.
- McAfee, B.J. y J.A. Fortin. 1986. Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. Can. J. Bot. 64: 848-852.

- Melin, E. 1921. Über die Mykorrhizenpilze von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.)Karst. Sven. Bot. Tidskr. 15: 192-203.
- Melin, E. 1922. Untersuchungen über die *Larix* Mykorrhiza. I. Synthese der Mykorrhiza in Reinkulture. Sven. Bot. Tidskr. 16: 161-196.
- Melin, E. 1923. Experimentelle Untersuchungen über die Birken und Espenmykorrhizen und ihre Pilzsymbionten. Sven. Bot. Tidskr. 17: 479-520.
- Melin, E. 1936. Methoden der experimentellen Untersuchung Mykotropher Pflanzen. Handb. Biol. Arbeitsmeth., Abt. 11: 1015-1108.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1950. Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. Physiol. Plant. 3: 88-92.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1952. Transfer of labelled nitrogen from an ammonium source to pine seedlings through mycorrhizal fungi. Sven. Bot. Tidskr. 46: 281-285.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1953. Transfer of labelled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Boletus variegatus* (Sw.)Fr. Nature 171: 134.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1954. Transport of labelled phosphorus to pine seedlings through the mycelium of *Cortinarius glaucopus* (Schaeff. ex Fr.)Fr. Sven. Bot. Tidskr. 48: 555-558.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1955. ⁴⁵Ca used as indicator of transport of cations to pine seedlings by means of mycorrhiza mycelium. Sven. Bot. Tidskr. 49: 119-121.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1957. Transport of C¹⁴ labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. Sven. Bot. Tidskr. 51: 166-186.
- Melin, E. y H. Nilsson. 1958. Translocation of nutritive elements through mycorrhizal mycelia to pine seedlings. Bot. Notis. 111: 251-256.
- Mention, M. y C. Plassard. 1983. Comparison between nitric and ammoniacal nutrition in four ectomycorrhizal Basidiomycete species. C.R. Seances Acad. Sci. Ser. III. Sci. Vie. 297: 489-492.
- Mexal, J.G. 1980. Aspects of mycorrhizal inoculations in relation to reforestation. *En: Root growth studies*. N.Z.J. For. Sci. 10: 208-217.
- Meyer, F.H. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and manmade forests. *En: Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology*. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press, New York, pp. 79-105.
- Mikola, P. 1965. Studies on the ectendotrophic mycorrhizae of pine. Acta For. Fenn. 79: 1-56.
- Mikola, P. 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. Int. Rev. For. Res. 3: 123-196.
- Mikola, P. 1973. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. *En: Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology*. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press, New York, pp. 383-411.
- Mikola, P., O. Laiho, J. Erikainen y K. Kuvaja. 1964. The effect of slash burning on the commencement of mycorrhizal association. Acta For. Fenn. 77: 1-12.
- Miller, C.O. 1967. Zeatin and zeatin riboside from a mycorrhizal fungus. Science 157: 1055-1057.
- Miller, O.K., Jr. 1983. Ectomycorrhizae in the Agaricales and Gasteromycetes. Can. J. Bot. 61: 909-916.
- Mitchell, R.J., G.S. Cox, R.K. Dixon, H.E. Garret y I.L. Sander. 1984. Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. 2. Foliar nutrient content and isolate effectiveness. For. Sci. 30: 563-572.
- Mohammed, G.H., K.R. Patel y W.E. Vidaver. 1989. The control of adventitious root production in tissue-cultured Douglas-fir. Can. J. For. Res. 19: 1322-1329.
- Molina, R. 1979a. Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. Can. J. Bot. 57: 1223-1228.
- Molina, R. 1979b. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lodgepole seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. For. Sci. 25: 585-590.
- Molina, R. 1980. Ectomycorrhizal inoculation of containerized western conifer seedlings. USDA Forest Service. Res. Note PNW-357. April 1980. 12 pp.

- Molina, R. 1981. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. Can. J. Bot. 59: 325-334.
- Molina, R. 1982. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. I. Consistency between isolates in effective colonization of containerized conifer seedlings. Can. J. For. Res. 12: 469-473.
- Molina, R. y J. Chamard. 1983. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. II. Effects of fertilizer forms and levels on ectomycorrhizal development and growth of container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. Can. J. For. Res. 13: 89-95.
- Molina, R. y J.G. Palmer. 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. En: Methods and principles of mycorrhizal research. N.C. Schenck (ed.). Am. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN. pp. 115-129.
- Molina, R. y J.M. Trappe. 1982a. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. For. Sci. 28: 423-458.
- Molina, R. y J.M. Trappe. 1982b. Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous hosts *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. New Phytol. 90: 495-509.
- Molina, R. y J.M. Trappe. 1982c. Applied aspects of ectomycorrhizae. En: Advances in agricultural microbiology. R. Subbay N.S. Oxford (eds.). IBH Publishing Co., New Delhi. pp. 305-324.
- Mortier, F., F. Le Tacon y J. Garbaye. 1988. Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas-fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. Ann. Sci. For. 45: 301-310.
- Moser, M. 1958. Die kunstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. I. Erfahrungen bei der Reinkultur von Mykorrhizapilzen. Forstwiss. Centralbl. 77: 32-40.
- Moser, M. 1959a. Pilz und Baum. Schweiz. Z. Pilzk. D. 37: 37-53.
- Moser, M. 1959b. Beiträge zur Kenntnis der Wuchsstoffbeziehungen im Bereich ectotropher Mykorrhizen I. Arch. Mikrobiol. 34: 251- 269.
- Moser, M. 1959c. Die kunstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen. III. Die Impfmethodik im Forstgarten. Forstwiss. Centralbl. 78: 193-202.
- Moser, M. 1963. Die Bedeutung der Mykorrhiza bei Aufforstungen unter besonderer Berücksichtigung von Hochlagen. En: Mykorrhiza W. Rawald y H. Lyr. (eds.). Fischer, Jena. pp. 407-424.
- Navratil, S. 1988. The state of the art in mycorrhiza research in Alberta and Saskatchewan. En: Proceedings of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry, May 1-4, 1988. M. Lalonde y Y. Piché (eds.). Centre de Recherche en Biologie Forestière, Faculté de Foresterie et de Géodésie, Université Laval, Sainte-Foy, Québec.
- Norkrans, B. 1949. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. Sven. Bot. Tidskr. 43: 485-490.
- Orr-Ewing, A.L. 1966. Inter- and intraspecific crossing in Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco. Silvae Genet. 15: 121-126.
- Owston, P.W. 1974. Two crop production of western conifers. En: Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedling Symp. R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council. Publ. 68. Denver, CO. pp. 104-111.
- Owston, P.W. y W.I. Stein. 1974. *Pseudotsuga*. En Seeds of woody plants in the United States. Agriculture Handbook No. 450. Forest Service. U.S.D.A. pp. 674-683.
- Parke, J.L., R.G. Linderman y C.H. Black. 1983. The role of ectomycorrhizas in the drought tolerance of Douglas-fir seedlings. New Phytol. 95: 83-95.
- Parke, J.L., R.G. Linderman, y J.M. Trappe. 1984. Inoculum potential of ectomycorrhizal fungi in forest soils of southwest Oregon and Northern California. For. Sci. 30: 300-304.
- Perrin, R., P. Duvert y C. Plenchette. 1988. Substrate receptiveness to mycorrhizal association: concepts, methods and applications. Acta Hort. 221: 223-228.
- Perry, D.A. y C.C. Choquette. 1987. Allelopathic effects on mycorrhizae. En: Allelopathy, its role in agriculture, forestry, and ecology. G. Waller (ed.). Am. Chem. Soc. Symp. Ser.

- 330, Washington, D.C.
- Perry, D.A. y S.L. Rose. 1983. Soil biology and forest productivity: opportunities and constraints. *En: IUFRO Symposium on Forest Site and Continuous Productivity*. R. Ballard y S.P. Gessel (eds.). U.S. Dep. Agric. For. Serv. Gen. Tech. Rep. PNW-163. pp. 229-238.
- Perry, D.A., R. Molina y M.P. Amaranthus. 1987. Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: current knowledge and research needs. *Can. J. For. Res.* 17: 929-940.
- Persson, H. 1982. Changes in the tree and dwarf shrub fine roots after clearcutting in mature Scots pine stand. *Swed. Conif. For. Proj. Tech. Rep. No 31*.
- Peyronel, B., B. Fassi, A. Fontana y J.M. Trappe. 1969. Terminology of mycorrhizae. *Mycologia* 61: 410-411.
- Phipps, H.M. 1974. Growing media affect size of container-grown red pine. *USDA For. Serv. Res. Note NC-165, Northcent. For. and Range Exp. Stn., St. Paul, Minn.* 4 pp.
- Piché, Y. y J.A. Fortin. 1982. Development of mycorrhizae, extramatrical mycelium and sclerotia on *Pinus strobus* seedlings. *New Phytol.* 91: 211-220.
- Piché, Y., J.A. Fortin, R.L. Peterson y U. Posluszny. 1982. Ontogeny of dichotomizing apices in mycorrhizal short roots of *Pinus strobus*. *Can. J. Bot.* 60: 1523-1528.
- Piché, Y., R.L. Peterson y C.A. Ackerley. 1983a. Early development of ectomycorrhizal short roots of pine. *Scanning Electron Microsc.* 3: 1467-1474.
- Piché, Y. R.L. Peterson, M.J. Howarth y J.A. Fortin. 1983b. A structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots. *Can. J. Bot.* 61: 1185-1193.
- Piché, Y., C.A. Ackerley y R.L. Peterson. 1986. Structural characteristics of ectomycorrhizas synthesized between roots of *Pinus resinosa* and the E-strain fungus *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae*. *New Phytol.* 104: 447-452.
- Piché, Y., R.L. Peterson y H.B. Massicotte. 1988. Host-fungus interactions in ectomycorrhizae. *En: Cell to Cell signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis*. S. Scannerini et al. (eds.). NATO ASI Series, Vol. H17. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 55-71.
- Pilz, D.P. y D.A. Perry. 1984. Impact of clearcutting and slash burning on ectomycorrhizal associations of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 14: 94-100.
- Pope, P.E. y W.R. Chaney. 1984. Influence of *Pisolithus tinctorius* and fertilization on the development of container grown red oak seedlings. *Third Biennial Southern Silvicultural Research Conference, 1984. Nov. 7-8; Atlanta, GA.* pp. 403-409.
- Read, D.J. 1984. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. *En: The ecology and physiology of the fungal mycelium*. D.H. Jennings y A.D. Rainer (eds.). *Symp. Br. Mycol. Soc.* 1983. Cambridge Univ. Press., Cambridge. pp: 215-240.
- Read, D.J., R. Francis y R.D. Finlay. 1985. Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. *En: Ecological interactions in soil*. A.H. Fitter, D. Atkinson, D.J. Read y M.B. Usher (eds.). Blackwell Sci. Publ., Oxford. pp. 193-218.
- Reid, C.P.P. 1971. Transport of ¹⁴C-labelled substances in mycelial strands of *Thelephora terrestris*. *En: E. Hacskaylo (ed.), U.S. Government Printing Office Washington*, pp. 222-227.
- Reid, C.P.P. y F.W. Woods. 1969. Translocation of C¹⁴-labeled compounds in mycorrhizae and its implications in interplant nutrient cycling. *Ecology* 50: 179-187.
- Richard, C. 1975. Quelques essais d'inoculation mycorrhizienne. *For. Chron.* 51: 188-194.
- Ridge, E.H., y C. Theodorou. 1972. The effect of soil fumigation on microbial recolonization and mycorrhizal infection. *Soil Biol. Biochem.* 4: 295-305.
- Ritchie, G.A. y J.R. Dunlop. 1980. Root growth potential: its development and expression in forest tree seedlings. *N.Z.J. For. Sci.* 10: 218-248.
- Rovillon, R., G. Gay, J. Bernillon, J. Favre-Bonvin y G. Bruchet. 1986. Analysis by HPLC-mass spectrometry of the indole compounds released by the fungus *Hebeloma hiemale* in pure culture. *Can. J. Bot.* 64: 1893-1897.

- Ruark, G.A., D.L. Mader y T.A. Tattar. 1982. The influence of soil compaction and aeration on the root growth and figure of trees: a literature review, Part 1. *Arboric. J.* 6: 251-265.
- Ruehle, J.L. 1980a. Inoculation of containerized loblolly pine seedlings with basidiospores of *Pisolithus tinctorius*. U.S.D.A. Forest Serv. Res. Note SE-291.
- Ruehle, J.L. 1980b. Ectomycorrhizal colonization of container-grown northern red oak as affected by fertility. Res. Note SE-298. Asheville, NC. USDA Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station, 5 p.
- Ruehle, J.L. y D.H. Marx. 1977. Developing ectomycorrhizae on containerized pine seedlings. U.S.D.A. Forest Serv. Res. Note SE-242.
- Ruehle, J.L. y C.G. Wells. 1984. Development of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on container-grown pine seedlings as affected by fertility. *For. Sci.* 30: 1010-1016.
- Ruehle, J.L., D.H. Marx, J.P. Barnett y W.H. Pawuk. 1981. Survival and growth of container-grown and bare-root shortleaf pine seedlings with *Pisolithus* and *Thelephora* ectomycorrhizae. *South. J. Appl. For.* 5: 20-24.
- Rupp, L.A. y L.W. Mudge. 1985. Mycorrhizal status of pines in nurseries. *J. Environ. Hortic.* 3: 118-123.
- Sampagni, R. y R. Perrin. 1985. Attempts to elucidate the mechanisms involved in the protective effect of *Laccaria laccata* against *Fusarium oxysporum*. *En: Physiological and genetic aspects of mycorrhizae. Proceedings of the First European Symposium on Mycorrhizae.* Dijon, 1-5 Juillet. INRA, Paris. pp. 807-810.
- Schoenberger, M.M. y D.A. Perry. 1982. The effect of soil disturbance on growth and ectomycorrhizae of Douglas-fir and western hemlock seedlings: a greenhouse bioassay. *Can. J. For. Res.* 12: 343-353.
- Schramm, J. R. 1966. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pennsylvania. *Trans. Am. Philos. Soc.* 56: 1-194.
- Shaw, C.G., R. Molina y J. Walden. 1982. Development of ectomycorrhizae following inoculation of containerized Sitka and white spruce seedlings. *Can. J. For. Res.* 12: 191-195.
- Shemakhanova, N.M. 1962. Mycotrophy of woody plants. *En: Academy of Sciences of the USSR Institute of Microbiology. Traducido por el "Israel program for Scientific Translations, Jerusalén,* 329 pp.
- Sinclair, W.A. 1974. Development of ectomycorrhizae in a Douglas-fir nursery. II. Influence of soil fumigation, fertilization, and cropping history. *For. Sci.* 20: 57-63.
- Sinclair, W.A., D.M. Sylvia y A.O. Larsen. 1982. Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *For. Sci.* 28: 191-201.
- Slankis, V. 1958. The role of auxins and other exudates in mycorrhizal symbiosis of forest trees. *En: Physiology of forest trees,* Thimann K.V. (eds.). Ronald Press, New York, pp. 427-443.
- Slankis, V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhizal development. *En: Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology.* G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press, New York. pp. 231-298.
- Smith, W.H. 1970. *Tree Pathology: a short introduction.* New York: Academic Press. 309 p.
- Smith, R.A. 1982. Nutritional study of *Pisolithus tinctorius* *Mycologia* 74: 54-58.
- Smith, A.H. y S.M. Zeller. 1966. A preliminary account of the North American species of *Rhizopogon*. *Mem. N.Y. Bot. Gard.* 14: 1-178.
- Smith, F.A. y S.E. Smith. 1986. Movement across membranes: physiology and biochemistry. *En: Mycorrhizae: physiology and genetics.* V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi (eds.). I.N.R.A.. Paris, pp: 75-84.
- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1980. *Statistical Methods.* Iowa State University Press. 507 pp.
- Spencer, H.A. 1974. To "engineer" the container. *En: Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedling Symp.* R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council. Publ 68., Denver, CO. p. 229-232.

- Stack, R.W., W.A. Sinclair, A.D. Larsen. 1975. Preservation of basidiospores of *Laccaria laccata* for use as mycorrhizal inoculum. *Mycologia* 67: 167-170.
- States, J.S. 1983. New records of hypogeous ascomycetes in Arizona. *Mycotaxon* 16: 396-402.
- States, J.S. 1984. New records of false truffles in pine forests of Arizona. *Mycotaxon* 19: 351-367.
- Stenström, E., M. Ek y T. Unestam. 1985. Prolonged effects of initially introduced mycorrhizae of pine plants after outplanting. *En: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the first European Symposium on mycorrhizae, Dijon, 1-5 juillet, INRA, Paris, 503-506.*
- Strullu, D.G. 1982. Etude des mécanismes d'accumulation du phosphore dans les champignons mycorrhiziens. *Colloq. I.N.R.A.* 13: 75-81.
- Sutton, R.F. 1979. Planting stock quality and grading. *For. Ecol. Manage.* 2: 123-132.
- Sutton, R.F. 1983. Root growth capacity: relationship with field root growth and performance in outplanting jack pine and black spruce. *Plant Soil* 71: 111-122.
- Sutton, J.C. y B.R. Sheppard. 1976. Aggregation of sand dune soil by endomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 54: 326-333.
- Takacs, E.A. 1967. Producción de cultivos puros de hongos micorrizógenos en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Castelar. *Idia* 4: 83-87.
- Tan, K.H., P. Sihanonth y R.L. Todd. 1978. Formation of humic acid like compounds by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 42: 906-908.
- Terwilliger, L. 1985. Hypogeous fungal diet of the red-tailed chipmunk (*Eutamias ruficaudus*). M.S. thesis, Department of Zoology, Washington State University, Pullman, WA.
- Theodorou, C. 1967. Inoculation with pure cultures of mycorrhizal fungi of radiata pine growing in partially sterilized soil. *Aust. For. Sci.* 31: 303-309.
- Theodorou, C. 1971. Introduction of mycorrhizal fungi into soil by spore inoculation of seed. *Aust. For.* 35: 23-26.
- Theodorou, C. y G.D. Bowen. 1970. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi. *Aust. For.* 34: 183-191.
- Theodorou, C. y G.D. Bowen. 1971. Influence of temperature on the mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D. Don. *Aust. J. Bot.* 19: 13-20.
- Theodorou, C. y G.D. Bowen. 1973. Inoculation of seeds and soil with basidiospores of mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 5: 765-771.
- Thomas, G. y K.K. Ching. 1968. A comparative karyotype analysis of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco and *Pseudotsuga wilsoniana* (Hayata). *Silvae Genet.* 18: 182-186.
- Tinus, R.W. 1974. Large trees for the Rockies and Plains. *En: Proc. North Am. Containerized For. Tree Seedling Symp.* R.W. Tinus, W.I. Stein y W.E. Balmer (eds.). Great Plains Agric. Council. Publ. 68. Denver, CO. pp. 112-118.
- Tinus, R.W. 1978. Root form: What differences does it make?. *En: Proc. Root form of planted trees symp.* E. Van Eerden y J.M. Kinghorn (eds.), May 16-19, 1978. Ministry of Forests/Can. For. Serv. Jt. Rep. 8. Victoria, B.C. p. 11-15.
- Tinus, R.W. y S.E. McDonald. 1979. How to grow tree seedlings in containers in greenhouses. USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep. RM-60, Rocky Mtn. For. and Range Exp. Stn., Fort Collins, CO. 256 pp.
- Tinus, R.W. y P.W. Owston. 1984. Physiology research made reforestation with container-grown seedlings successful. *En: Seedling physiology and reforestation success.* M.L. Duryea y G.N. Brown (eds.). Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Pub., Dordrecht. 325 pp.
- Tisdall, J.M. y J.M. Oades. 1979. Stabilization of soil aggregates by the root systems of ryegrass. *Aust. J. Soil Res.* 17: 429-441.
- Tisdall, J.M. y J.M. Oades. 1982. Organic matter and water stable aggregates in soil. *J. Soil Sci.* 33: 141-164.
- Toval, G., G. Vega y G. Puerto. 1982. Introducción de especies. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. I.N.I.A. Pontevedra. 21 pp.

- Trappe, J.M. 1962a. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28: 538-606.
- Trappe, J.M. 1962b. *Cenococcum graniforme*- its distribution, ecology, mycorrhiza formation, and inherent variation. PhD thesis. Univ. Wash., Seattle. 148 pp.
- Trappe, J.M. 1967. Pure culture synthesis of Douglas-fir mycorrhizae with species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon* y *Astraeus*. *For. Sci.* 13: 121-130.
- Trappe, J.M. 1969. Studies on *Cenococcum graniforme*. I. An efficient method for isolation from sclerotia. *Can. J. Bot.* 47: 1389-1390.
- Trappe, J.M. 1971. Mycorrhiza-forming Ascomycetes. *En: Mycorrhizae*. E. Hacskeylo (ed.). USDA Forest Service Misc. Publ. 1189. U.S. Gov. Printing Off., Washington, D.C. pp. 19-37.
- Trappe, J.M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 203-222.
- Trappe, J.M. 1981. Mycorrhizae and productivity of arid and semiarid rangelands. *En: Advances in food producing systems for arid and semi arid lands*. J.T. Manassah y E.J. Briskey (eds.). Acad. Press, Inc., New York. pp. 581-599.
- Trappe, J.M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. *En: Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. G.R. Safir (ed.). CRC Press. pp. 5-25.
- Trappe, J.M. y R.D. Fogel. 1977. Ecosystematic functions of mycorrhizae. *En: The belowground ecosystem: A synthesis of plant-associated processes*. U.S.D.A. Forest Service, Range Sci. Dep. Sci. Ser. No. 26. Colorado State Univ., Fort Collins, CO. pp. 205-214
- Trappe, J.M. y R. Molina. 1986. Taxonomy and genetics of mycorrhizal fungi: their interactions and relevance *En: Physiological and genetic aspects of mycorrhizae*. V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi (eds.). INRA, Paris. pp. 133-146.
- Trappe, J.M. y R.F. Strand 1969. Mycorrhizal deficiency in a Douglas-fir region nursery. *For. Sci.* 15: 381-389.
- Tyminska, A. F. Le Tacon y J. Chadoeuf. 1986. Effect of three ectomycorrhizal fungi on growth and phosphorus uptake of *Pinus sylvestris* seedlings at increasing phosphorus levels. *Can. J. Bot.* 64: 2753-2757.
- Ulrich, J.M. 1960. Effect of mycorrhizal fungi and auxins on root development of sugar pine seedlings (*Pinus lambertiana* Dougl.). *Physiol. Plant.* 13: 493-504.
- Van der Plank, J.E. 1975. Principles of plant infection. Academic Press, New York. 216 pp.
- Van Eerden, E. y J.M. Kinghorn (eds.). 1978. Proceedings of the Root Form of Planted Trees Symposium, May 16-19, 1978. Ministry of Forests, Canadian Forest Service, Ottawa. Jt. Rep. No 8. Victoria, B.C.
- Villeneuve, N., F. Le Tacon y D. Bouchard. 1991. Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas-fir seedlings. *Plant Soil* 135: 95-107.
- Vozzo, J.A. y E. Hacskeylo. 1971. Inoculation of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. *For. Sci.* 17: 239-245.
- Wilcox, H.E. 1964. Xylem in roots of *Pinus resinosa* Ait. in relation to heterorhizy and growth activity. *En: The formation of wood in forest trees*. M.H. Zimmerman (ed.). Academic Press, New York. pp. 459-478.
- Wilcox, H.E. 1967. Seasonal patterns of root initiation and mycorrhizal development in *Pinus resinosa* Ait. *En: Proc. 14th Congress of the International Union of Forest Research Organizations, Part V, Sect. 24. Munich.* pp. 29-39.
- Wilcox, H.E. 1968. Morphological studies of the roots of red pine, *Pinus resinosa*. II. Fungal colonization of roots and the development of mycorrhizae. *Amer. J. Bot.* 55: 686-700.
- Wilcox, H.E. y R. Ganmore-Neumann. 1974. Ectendomycorrhizae in *Pinus resinosa* seedlings. I. Characteristics of mycorrhizae produced by a black imperfect fungus. *Can. J. Bot.* 52: 2145-2155.
- Wilcox, H.E. y C.J.K. Wang. 1987. Ectomycorrhizal and ectendomycorrhizal associations of *Phialophora finlandia* with *Pinus resinosa*, *Picea rubens* and *Betula*

- alleghaniensis*. Can. J. For. Res. 17: 976-990.
- Wilcox, H.E., R. Ganmore-Neumann y C.J.K. Wang. 1974. Characteristics of two fungi producing ectendomycorrhizae in *Pinus resinosa*. Can. J. Bot. 52: 2279-2282.
- Wilson, B.F. 1970. Evidence for injury as a cause of tree root branching. Can. J. Bot. 48: 1497-1498.
- Yang, C.S. y R.P. Korf. 1985a. *Ascorhizoctoria* Gen. Nov. and *Complexipes* Emend., two genera for anamorphs of species assigned to *Tricharina* (Discomycetes). Mycotaxon 23: 457-481.
- Yang, C.S. y R.P. Korf. 1985b. A monograph of the genus *Tricharina* and a new segregate genus, *Wilcoxina* (Pezizales). Mycotaxon 24: 467-531.
- Yang, C.S. y H.E. Wilcox. 1984. Technique for observation of mycorrhizal development under monoxenic conditions. Can. J. Bot. 62: 251-254.
- Zak, B. 1969a. Characterization and classification of mycorrhizae of Douglas-fir. I. *Pseudotsuga menziesii* + *Poria terrestris* (blue- and orange-staining strains). Can. J. Bot. 47: 1833-1840.
- Zak, B. 1969b. Characterization and classification of Douglas-fir mycorrhizae. Proceedings of the First North American Conference on Mycorrhizae. April 1969. USDA Forest Service. Misc. Publication 1189. pp. 38-53.
- Zak, B. 1971. Characterization and classification of mycorrhizae of Douglas-fir. II. *Pseudotsuga menziesii* + *Rhizopogon vinicolor*. Can. J. Bot. 49: 1079-1084.
- Zak, B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. *En: Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). Academic Press. New York, London, pp. 43-78.
- Zak, B. y W.C. Bryan. 1963. Isolation of fungal symbionts from pine mycorrhizae. For. Sci. 9: 270-278.
- Zak, B. y D.H. Marx. 1964. Isolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines. For. Sci. 10: 214-222.

ANEXO 1

Resultados globales de los ensayos de inoculaciones monoespecíficas de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco) con diferentes tipos de inóculo de hongos ectomicorrícicos seleccionados.

HONGO	TIPO INOCULO ^a	RESULTADO ^b
<i>Hebeloma cylindrosporum</i> S-20	T:V	-
<i>H. sinapizans</i> A-126	T:V	+
<i>Hymenogaster vulgaris</i>	ES	+
<i>Laccaria bicolor</i> S-238	AL / T:V	+ / +
<i>L. laccata</i> A-127	T:V	+
<i>Lyophyllum decastes</i> A-71	T:V	+
<i>Melanogaster broomeianus</i>	ES	+
<i>Paxillus involutus</i> A-87	T:V	-
<i>Pisolithus tinctorius</i> A-93	AL / ES / T:V	- / + / -
<i>Rhizopogon luteolus</i>	ES	-
<i>R. roseolus</i> A-96	ES / T:V	- / -
<i>R. subareolatus</i> A-116	AL / ES / T:V	- / + / -
<i>R. vulgaris</i> A-56	ES / T:V	- / -
<i>Scleroderma verrucosum</i> A-21	ES	-
<i>Suillus bovinus</i> A-21	T:V	-
<i>S. bovinus</i> A-75	T:V	-
<i>S. collinitus</i> l-1	T:V	-
<i>Tuber maculatum</i>	ES	+

(a): Tipo de inóculo

AL: Inclusión de micelio en alginato de sodio

ES: Inóculo de esporas

T:V: Inóculo vegetativo en turba y vermiculita

(b): Resultados de la inoculación (en el mismo orden que los métodos)

+: Formación de micorrizas

-: No formación de micorrizas

ANEXO 2

Especies de hongos utilizadas en los ensayos de formación de ectomicorrizas.

Amanita aspera (Fr.)Hooker
A. citrina (Schff.)S.F. Gray (= *A. mappa* (Bastch ex Lasch)Quél.)
A. muscaria (L. ex Fr.)Hooker
A. rubescens (Pers. ex Fr.)Gray
Boletus edulis Bull ex Fr. (= *B. bulbosus* Schaeff.)
B. erythropus Fr. ex Pers. (= *Tubiporus erythropus* (Fr.)Maire)
B. pulverulentus Opat.
C. geophilum Fr.
Cortinarius purpurascens Fr.
Hebeloma cylindrosporum Romagn.
H. sinapizans (Paulet ex Fr.)Gill.
Hymenogaster vulgaris Tul.
Laccaria bicolor (R. Mre.)Orton
L. laccata (Scop. ex Fr.)Bk. e Br.
Lactarius deliciosus Fr.
L. rufus (Scop.)Fr.
Lyophyllum decastes (Fr.)Sing. (= *Clitocybe aggregata* (Fr.)Gill.)
Melanogaster ambiguus (Vitt.)Tul.
Paxillus involutus (Batsch)Fr.
Pisolithus tinctorius (Pers.)Coker & Couch (= *P. arhizus* (Scop. ex Pers.))
Rhizopogon colossus Smith
R. ellенаe Smith
R. hawkeri Smith
R. luteolus Fr. & Nord.
R. mutabilis Smith
R. occidentalis Zeller & Dodge
R. roseolus (Corda)Hollos
R. subareolatus Smith
R. subcaerulescens Smith
R. ventricisporus Smith
R. vulgaris (Vitt.)M. Lange
Scleroderma citrinum Pers. (= *S. vulgare* Horn.)
S. verrucosum Vaill. ex Pers.
Suillus bovinus (L. ex Fr.)O. Kuntze
S. collinitus (Fr.)O. Kuntze
S. luteus (L. ex Fr.)S.F. Gray (= *Boletus luteus* L. ex Fr.)
Tricholoma saponaceum (Fr.)Kummer
Tuber maculatum Vitt.
Xerocomus chrysenteron (Bull. ex St. Am.)Quél.