

Selección de hongos ectomicorrícicos de
Pinus pinaster Ait. para su aplicación
en reforestación

Joan Pera Alvarez

Tesis Doctoral

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIENCIES

Selección de hongos ectomicorrícicos
de *Pinus pinaster* Ait. para su
aplicación en reforestación

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

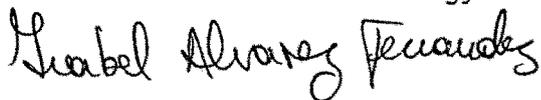
Autor:

Joan Pera i Alvarez
Licenciado en Ciencias Biológicas



Directores de tesis:

Isabel Alvarez Fernández
Ph.D. en Plant Pathology



Josep Girbal i Lladó
Dr. en Ciencias Biológicas



1992

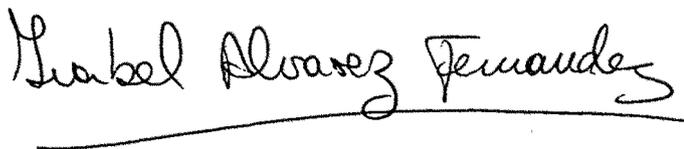
Isabel Alvarez Fernández, en calidad de Jefe del Departamento de Patología Vegetal del 'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries' (I.R.T.A.).

CERTIFICA:

Que D. Joan Pera i Alvarez, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universitat Autònoma 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:

Selección de hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* Ait. para su aplicación en reforestación

y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Cabrils, a 5 de Octubre de 1992.

A handwritten signature in cursive script, reading "Isabel Alvarez Fernandez", written in black ink. The signature is positioned above a horizontal line that spans the width of the text.

Fdo. Isabel Alvarez Fernández
Jefe del Departamento de Patología Vegetal (IRTA)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra Isabel Alvarez, Jefe del Dpto. de Patología Vegetal del IRTA, la dirección de esta Tesis, su confianza y apoyo durante muchos años y sus numerosas sugerencias desde la planificación de los experimentos hasta la escritura de la memoria.

Así mismo, quiero agradecer la codirección del Dr Josep Girbal del Dpto. de Biología Animal, Vegetal y Ecología de la Universitat Autònoma de Barcelona, y al citado Dpto. la aceptación de esta tesis.

El trabajo experimental se desarrolló totalmente en el 'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries' (IRTA) y agradezco a este instituto las facilidades ofrecidas en todo momento.

A todos los compañeros del Dpto. de Patología Vegetal del IRTA debo agradecer su ayuda y estímulo. Particularmente a Xavier Parladé, por su apoyo y ayuda constantes en todo el trabajo conjunto realizado y su desinteresada colaboración en la planificación del trabajo y la discusión de los resultados. También, y de una forma muy especial, quiero expresar mi agradecimiento a Cinta Calvet, Amelia Camprubí y Victoria Estaún, con quienes he compartido, desde el principio, proyectos de futuro y trabajo diario, y han contribuido a que todo ello fuera mucho más agradable. A Marisa Cunill y M^a del Valle Montero, auxiliares del Dpto. de Patología Vegetal (IRTA), quiero agradecerles su cooperación y dedicación, que sin duda hizo mucho más fácil mi trabajo.

Agradezco al Dr Robert Perrin (INRA de Dijon, Francia) toda su desinteresada ayuda en una gran parte de los experimentos realizados, así como sus valiosos consejos y comentarios durante y después de su estancia en nuestro Dpto.

Mi gratitud a los Drs : Michael Castellano, Carlos Colinas, Randy Molina y James Trappe (Forestry Sciences Lab., Corvallis, Oregon. USA) por su valiosa contribución en el aislamiento e identificación de una parte de los cultivos de hongos ectomicorrícicos utilizados en este trabajo.

A los Drs François Le Tacon y Daniel Bouchard (INRA de Nancy, Francia), al Dr Chris Walker (Forestry Commission, U.K.) y al Dr Richard Jackson (Univ. de Surrey, U.K.) quiero agradecerles las cepas ectomicorrícicas proporcionadas, sus palabras de ánimo y estímulo y todas las interesantes sugerencias realizadas a lo largo de nuestra cooperación en proyectos de investigación.

Al Dr Antoni Nadal y a Forestal Catalana S.A. debo expresar mi agradecimiento por las facilidades ofrecidas y la disponibilidad de parte de sus viveros, en los que se realizaron varias prospecciones. Actitud que refleja su interés en innovar y mejorar la producción viverística en nuestro país.

Quiero agradecer a los Srs Joan Botey y Emili Garolera (ConSORCI Forestal de Catalunya) su generosa colaboración al poner a nuestra disposición sus plantaciones forestales, en las que se obtuvieron numerosas recolecciones y muestras para la realización de gran parte de los experimentos. Su activo interés demuestra el alto nivel de muchos propietarios forestales de nuestro país.

Finalmente, agradezco a Laura, Xavier y Francesc, a mis padres y a toda mi familia, su cariño, su entrega y su apoyo incondicional. Ellos han compartido conmigo los buenos momentos y me han ayudado a superar los malos. Sin su contribución todo habría sido mucho más difícil.

A todos ellos dedico este trabajo.

INDICE

Presentación y Objetivos	1
Introducción General	7
<i>Pinus pinaster</i> Alton	7
Descripción y taxonomía	7
Distribución geográfica y área natural	9
Características	12
Regeneración natural y regeneración artificial	14
Utilización de la madera de <i>P. pinaster</i>	15
Origen del material vegetal y producción de planta para reforestación	16
Silvicultura	19
La simbiosis ectomicorrícica.	21
Micorrizas en las especies forestales: efectos sobre la planta e importancia en el ecosistema	21
Aplicación de la micorrización controlada en la práctica forestal	26
Hongos ectomicorrícicos de <i>Pinus pinaster</i> en el norte de España	37
Introducción	37
Materiales y Métodos	42
<i>Hongos ectomicorrícicos. Aislamiento y mantenimiento en cultivo puro</i>	42
<i>Síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro</i>	47
Desinfección, estratificación y germinación de semillas	47
Preparación de cultivos fúngicos	48
Síntesis de ectomicorrizas	48
<i>Especificidad por la planta hospedadora de distintos hongos ectomicorrícicos para <i>P. pinaster</i></i>	49

Resultados	51
<i>Síntesis de ectomicorrizas con P. pinaster</i>	51
<i>Especificidad de los hongos ectomicorrícicos de P. pinaster frente a otras especies de coníferas</i>	63
Discusión	63
Selección de hongos y evaluación de técnicas de inoculación para la micorrización controlada de <i>P. pinaster</i> en condiciones de vivero en contenedor.	79
Introducción	79
Material y Metodos	80
<i>Producción de P. pinaster en contenedor y condiciones de crecimiento de las plantas</i>	80
<i>Técnicas de inoculación y dosificación de inóculo ectomicorrícico</i>	81
Inoculaciones con inóculo micelial producido en sustrato de turba-vermiculita	81
<i>Preparación del inóculo</i>	81
<i>Selección de cepas ectomicorrícicas para su aplicación en forma de inóculo micelial en turba-vermiculita.</i>	82
<i>Determinación de la dosis óptima de inóculo de las cepas seleccionadas.</i>	84
Inoculaciones con micelio incluido en alginato polimerizado.	85
<i>Preparación del inóculo.</i>	85
<i>Determinación de la dosis óptima de inóculo.</i>	86
Inoculaciones con esporas.	87
<i>Preparación del inóculo.</i>	87
<i>Selección de especies ectomicorrícicas para su aplicación en forma de esporas.</i>	88
<i>Determinación de la dosis óptima de inóculo de las especies seleccionadas.</i>	89

Resultados	90
<i>Inóculo micelial en turba vermiculita</i>	90
Selección de cepas ectomicorrícicas para su aplicación en forma de inóculo micelial en turba-vermiculita.	90
Dosis óptima de inóculo de las cepas seleccionadas	91
<i>Inóculo micelial incluido en alginato polimerizado</i>	97
<i>Inóculo preparado con esporas</i>	103
Selección de especies ectomicorrícicas para su aplicación en forma de esporas.	103
Dosis óptima de inoculación.	103
Discusión.	110
Desarrollo de técnicas para estimar la infectividad de distintos suelos forestales y su receptividad a la introducción de hongos ectomicorrícicos seleccionados.	121
Introducción.	121
Materiales y Métodos.	123
<i>Suelos : recogida y características.</i>	123
<i>Potencial infectivo ectomicorrícico de los distintos suelos forestales.</i>	124
<i>Receptividad de distintos suelos forestales a las especies de hongos ectomicorrícicos seleccionadas para P. pinaster.</i>	127
Resultados.	129
<i>Potencial infectivo ectomicorrícico de los distintos suelos forestales.</i>	129
<i>Receptividad de los distintos suelos forestales a las especies de hongos ectomicorrícicos seleccionadas para P. pinaster.</i>	134
Discusión.	140

Apéndice	151
Estado micorrícico de <i>Pinus pinaster</i> en cinco viveros de Cataluña.	
Introducción.	151
Materiales y métodos.	152
<i>Localización de los viveros.</i>	152
<i>Recogida de muestras.</i>	153
<i>Procesado de las muestras.</i>	156
<i>Aislamiento de hongos ectomicorrícicos en cultivo puro a partir de raíces micorrizadas.</i>	156
<i>Crecimiento de las plántulas de P. pinaster en los suelos de los viveros.</i>	157
Resultados.	158
<i>Estado de las plantas de P. pinaster en los viveros sometidos a muestreo.</i>	158
<i>Estado micorrícico de las plantas de P. pinaster en los viveros sometidos a muestreo.</i>	158
<i>Capacidad ectomicorrícica de los hongos aislados.</i>	161
<i>Crecimiento y estado micorrícico de P. pinaster producido en contenedor y usando como substrato los suelos de los distintos viveros.</i>	162
Discusión.	164
Conclusiones Generales.	169
Bibliografía.	173

PRESENTACION Y OBJETIVOS ¹

Pinus pinaster Ait. se localiza en las regiones costeras del mediterráneo occidental y se extiende hasta las costas atlánticas de Portugal, España, y Francia. Dentro del territorio español, las masas naturales de esta especie ocupan del orden de 600.000 ha y las repoblaciones realizadas en los últimos 40 años sobrepasan las 800.000 ha, siendo una de las especies forestales más importantes y extendidas. Según datos oficiales, las repoblaciones efectuadas con *P. pinaster*, hasta el año 1987, representan el 25 % del total de la superficie repoblada por acción directa de la Administración y la superficie total de monte alto ocupada por esta especie es de 1.505.000 ha, lo cual representa el 20 % del total de la superficie forestal destinada a la producción de madera.

Pinus pinaster es una especie poco exigente, muy adaptable a las variaciones de suelo y clima, y capaz de soportar sin dificultad las altas temperaturas. Una de sus características más importantes es la tolerancia a los suelos de escasa fertilidad, en los que pueden desarrollarse muy pocas especies de interés económico. Por este motivo, se ha utilizado con gran éxito para la fijación de dunas y la repoblación de terrenos empobrecidos por la erosión.

El principal producto obtenido de esta especie ha sido la resina, pero los campos de aplicación de la madera de *P. pinaster* han conocido una evolución espectacular durante los últimos 50 años.

La utilización futura de esta especie está ligada al uso de plantas genéticamente mejoradas. La disponibilidad de este tipo de material no será ilimitada y, por tanto, habrá que recurrir a métodos que permitan un mejor aprovechamiento de la semilla, es decir, la repoblación con plantas producidas en vivero en lugar de la siembra directa de semillas. La producción de planta a raíz desnuda es una técnica simple y económica que predomina en las

¹

En este apartado se expone una breve introducción sobre el tema y los objetivos perseguidos en el trabajo realizado. En el capítulo "Introducción General" se presenta una revisión extensa sobre los conocimientos actuales en el campo de las ectomicorrizas y su aplicación en reforestación.

regiones templadas y se utiliza especialmente cuando las condiciones de plantación son favorables. En cambio, las plantas producidas en contenedor soportan mejor las condiciones adversas de los procesos de transporte y plantación que suelen darse en las regiones cálidas y secas. La producción en contenedor resulta más costosa que la producción a raíz desnuda, pero la contrapartida viene dada por la mayor rapidez en la producción y la mejor calidad de la planta producida en contenedor. Esta mejora de la calidad se traduce en una mayor supervivencia al trasplante y un mayor crecimiento durante los primeros años en campo.

La producción forestal se realiza frecuentemente en suelos pobres en elementos minerales nutritivos, especialmente nitrógeno y fósforo. La búsqueda de técnicas que permitan mejorar el crecimiento de los árboles sin la utilización de prácticas costosas o contaminantes, como el aporte de fertilizantes o la aplicación de pesticidas y herbicidas, es uno de los grandes objetivos de la investigación forestal.

La gran mayoría de las plantas terrestres se caracterizan por establecer algún tipo de simbiosis micorrícica de forma natural y constante. Las ectomicorrizas son el tipo dominante y más importante entre las especies forestales.

La simbiosis ectomicorrícica aumenta la absorción de agua y nutrientes minerales. Muchos hongos ectomicorrícicos proporcionan a la planta sustancias vitamínicas (biotina, tiamina, ácido pantoténico) y compuestos reguladores del crecimiento vegetal (auxinas, citoquininas, etileno, giberilinas). Algunos pueden actuar como potenciales agentes de control biológico frente a determinados patógenos radicales.

Las principales especies forestales, objeto de una intensa reforestación en todo el mundo, son muy dependientes de la simbiosis ectomicorrícica. La rentabilidad del monte es generalmente baja y a largo plazo. Las explotaciones forestales ocupan suelos pobres, donde las funciones de absorción y movilización de nutrientes aportadas por los hongos ectomicorrícicos serán de gran importancia. Todo ello hace que la reforestación constituya un campo idóneo para la aplicación de la simbiosis micorrícica con vistas a mejorar la producción vegetal.

El objetivo final de la micorrización controlada es aumentar la eficacia en el establecimiento de masas forestales mediante la disminución de la

mortalidad tras el trasplante a campo y la aceleración del crecimiento inicial de las plantas. La micorrización controlada también puede facilitar la recuperación de suelos degradados o erosionados y proporcionar usos alternativos para el monte, tales como la producción de determinadas setas comestibles (*Lactarius deliciosus*, *Tuber melanosporum* y distintas especies de *Suillus*).

La inoculación con hongos ectomicorrícicos en todo tipo de viveros, y su efecto en los procesos de reforestación en distintos países y condiciones ecológicas, han sido ampliamente estudiados y revisados. Actualmente, no existe ninguna duda de que las micorrizas son una parte esencial del ecosistema forestal y que tienen un potencial real de aplicación en los programas forestales de todo el mundo. En España, a pesar de que *P. pinaster* es una de las especies forestales más importantes, se ha dedicado un escaso esfuerzo de investigación al estudio de sus hongos ectomicorrícicos asociados.

Para la mayoría de especies vegetales existe un amplio abanico de potenciales hongos ectomicorrícicos. Determinadas especies fúngicas, e incluso cepas de una misma especie, producen efectos distintos sobre el crecimiento de la planta en distintas condiciones ecológicas. Por tanto, uno de los pasos más importantes, en todo programa de inoculación en vivero, es la selección del hongo ectomicorrícico.

Para poder producir cantidades suficientes de inóculo y ser utilizada a escala práctica, la cepa ectomicorrícica seleccionada ha de poder crecer fácilmente en cultivo puro y sobrevivir sin dificultad a los procesos de producción y aplicación de inóculo. Además, las micorrizas formadas por la cepa seleccionada han de soportar los procesos ligados al establecimiento de una plantación forestal y mantenerse en el sistema radical de la planta, adaptándose a las condiciones ecológicas de la zona y resistiendo la competencia ejercida por la microflora del suelo y la rizosfera.

El objetivo general de esta tesis es (i) la selección de cepas o especies de hongos ectomicorrícicos para *P. pinaster* y (ii) la adaptación o desarrollo de técnicas de producción y aplicación de inóculo ectomicorrícico. La aplicación de las cepas seleccionadas y las técnicas desarrolladas permitiría mejorar la calidad de la planta destinada a reforestación.

La consecución de este objetivo general requiere distintos pasos para la obtención y evaluación del material:

1.- Obtención del material de selección.

El primer objetivo abordado fue el conocimiento e identificación de las especies de hongos ectomicorrícicos dentro del area dedicada a la producción de *P. pinaster* en el norte de España, y el aislamiento y mantenimiento en cultivo puro de varias cepas de hongos, potencialmente ectomicorrícicos, con vistas a crear un banco de cultivos puros que constituiría el material sometido a selección.

2.- Determinar la compatibilidad simbiótica con *P. pinaster*. (Selección a nivel de laboratorio).

El primer nivel de selección se centró en determinar, mediante síntesis en cultivo puro, la capacidad de las distintas cepas fúngicas aisladas para formar ectomicorrizas con *P. pinaster*. La selección a nivel de laboratorio considera también, indirectamente, algunos aspectos como: la viabilidad del cultivo, la rapidez de crecimiento en medios de laboratorio y la tolerancia a la manipulación asociada a la producción de inóculo (conservación en frío, resistencia a la homogeneización, ...).

3.- Determinar los métodos de inoculación y dosificación de inóculo para cada especie fúngica. (Selección a nivel de condiciones de vivero.).

Una vez delimitadas las especies ectomicorrícicas más infectivas para *P. pinaster*, se procedió a determinar el método de inoculación y el tipo de inóculo más adecuado para cada una de ellas, así como a establecer la dosis de inoculación óptima para cada tipo de inóculo y especie fúngica.

El objetivo global era adaptar y/o desarrollar la tecnología necesaria para la aplicación de la micorrización controlada a la producción en contenedor de *P. pinaster* en condiciones de vivero. A este nivel se detectarían otros problemas (baja tasa de infección en las condiciones reales de la producción de inóculo, sensibilidad del hongo a los niveles de fertilidad normales, irregularidad en los resultados por falta de adaptación del hongo a las condiciones del vivero, baja viabilidad del inóculo,...) que delimitarían la selección a nivel de su aplicación práctica.

La estimulación del crecimiento de la planta en vivero, aunque deseable, no debe ser, necesariamente, un carácter de selección ni una finalidad en si mismo. El objetivo final es obtener una respuesta en plantación, y se ha demostrado que la clasificación de distintos hongos, en función de su eficacia, puede ser muy distinta en vivero y en plantación.

- 4.- Determinar la capacidad de persistencia del hongo ectomicorrícico en el sistema radical de plántones de *P. pinaster* trasplantados a distintos suelos de plantación.

Aquellos hongos que producen una fuerte estimulación del crecimiento del árbol perderán su potencial efecto beneficioso si no son capaces de mantenerse en el sistema radical de las plantas una vez sean trasplantadas a campo. El mantenimiento del hongo en las raíces de la planta dependerá, en gran medida, de su capacidad para adaptarse a las condiciones fisicoquímicas del suelo y de su capacidad para competir con la micoflora ectomicorrícica nativa del suelo de plantación.

El objetivo de este apartado es evaluar la capacidad competitiva y de adaptación de los distintos hongos ectomicorrícicos preseleccionados para *P. pinaster*. El test último y definitivo para determinar el valor de una cepa ectomicorrícica lo constituye el establecimiento de plantaciones experimentales para la comparación de resultados de una forma integrada. La información completa sobre la eficacia, la adaptabilidad y el campo de aplicación de un hongo, se obtendrá a largo plazo, con ensayos en distintos tipos de estación y distintas técnicas de plantación. Por el momento, la imposibilidad de ofrecer resultados a largo plazo, obliga a centrar la evaluación de los hongos inoculados en otros parámetros. Este apartado pretende complementar los resultados obtenidos y establecer posibles tendencias en los futuros experimentos de trasplante a campo.

INTRODUCCION GENERAL

Pinus pinaster

Descripción y taxonomía.

Pinus pinaster Aiton pertenece a la sección Ponderosa-banksiana, subsección banksiana del género *Pinus*, familia *Pinaceae*.

Es un árbol de talla mediana (20-40 m), de copa cónica y densa en estadios juveniles y más redondeada y clara en la madurez. Las ramas son erectas, horizontales y regularmente verticiladas. La corteza es gruesa y muy fisurada, gris negruzca y áspera en la juventud, luego pardo rojiza separada por surcos rojizos. Las acículas están envainadas en grupos de 2 y son rígidas, gruesas y largas (2-2.5 mm de ancho x 10-25 cm de largo), de color verde intenso, acanaladas o aplanadas en la cara interna, finamente aserradas en los bordes; permanecen en el árbol durante 3 ó 4 años. Florece a partir del séptimo u octavo año. Las flores femeninas son de color rojo y están situadas en el extremo del brote terminal de las ramas superiores. Las flores masculinas se localizan en la base de los brotes en elongación de las ramas medias o inferiores. Las piñas, de 9 a 22 cm de longitud, son oblongo-cónicas, subagudas, subsésiles, rojizas y brillantes, con los escudetes prominentes y agudamente carenados; maduran en el otoño del segundo año. Los piñones, de 5 a 8 mm de longitud y de cubierta poco dura, presentan una de las caras de color negro brillante y la otra gris. El ala es 3 ó 5 veces más larga que la semilla, de color marrón y estriada por bandas negras longitudinales.

Pinus pinaster presenta una gran variabilidad infraespecífica, reflejo de la fragmentación de su área natural. Los estudios realizados sobre las características anatómicas de las acículas, utilizando como criterio taxonómico el número de canales resiníferos presentes bajo la vaina (Fieschi, 1932), llevaron a separar dos especies: 1) *Pinus maritima* Miller, para el tipo

atlántico (con 2 canales resiníferos) y 2) *Pinus mesogeensis* Fieschi et Gaussen, para el tipo mediterráneo (con más de 2 canales resiníferos) (Fieschi y Gaussen, 1932). Posteriormente, ni la importancia taxonómica del carácter (Huguet del Villar, 1933) ni la propia variabilidad encontrada (March, 1939; Pinto da Silva, 1947) permitieron mantener esta separación.

Algunos autores aceptaron la existencia de dos subespecies (Tutin y Heywood, 1964; Mirov, 1967): 1) *Pinus pinaster* Ait. ssp. *atlantica* Huguet del Villar con acículas de 10 a 20 cm y piñas de 9 a 18 cm de longitud, que se encontraría distribuida en la costa atlántica de Portugal, España y Francia, y 2) *Pinus pinaster* Ait. ssp. *pinaster* [*P. mesogeensis* Fiesche et Gaussen] con las acículas de 18 a 25 cm y las piñas de 14 a 22 cm de longitud, que se extendería por el centro y el oeste de la región mediterránea. Sin embargo, existen discusiones sobre la aceptación de estas subespecies, ya que los caracteres distintivos no se muestran constantes ni siquiera en sus áreas de origen y las diferencias entre ambas podrían ser el resultado de alteraciones provocadas por el cultivo de la planta mediterránea en regiones atlánticas (Franco, 1986).

Estudios más recientes (Baradat, 1986) han llevado a establecer y diferenciar cinco razas geográficas (r.g.) principales: 1) r.g. *Maghreb*, a la que pertenecerían las poblaciones de Marruecos, Argelia y Túnez; 2) r.g. *Mediterránea Occidental*, que ocuparía el Sur y el Este de la península Ibérica, Var, Alpes marítimos e Italia; 3) r.g. *Corsa*, localizada en la isla de Córcega; 4) r.g. *Ibérica del Noroeste*, presente en Portugal, Galicia, Asturias y Norte de Castilla; y 5) r.g. *Landesa*, representada por las masas de Aquitania. Los estudios realizados utilizando los terpenos presentes en las semillas como marcadores bioquímicos (Baradat y Marpeau, 1988), han permitido diferenciar tres grandes grupos de poblaciones: el grupo atlántico, que incluiría las razas *Landesa* e *Ibérica del Noroeste*; el grupo mediterráneo europeo, al que pertenecerían la raza *Corsa* y las poblaciones del este de la Península Ibérica, Provenza, Liguria, Toscana y norte de Cerdeña; y el grupo maghrebí, que comprendería la raza geográfica *Maghreb* y las poblaciones del sur de la Península Ibérica y la isla de Pantelleria. Esta pauta de distribución se ha confirmado también con los estudios realizados sobre 21 sistemas enzimáticos en semillas de siete poblaciones naturales de *P. pinaster* (Petit, 1988).

Distribución geográfica y área natural.

Esta especie se localiza en las regiones costeras del mediterráneo occidental y llega al litoral atlántico por Portugal, Galicia, Asturias y Aquitania. También se pueden encontrar plantaciones de *P. pinaster* en Bélgica (Campine) y Dinamarca (isla de Samsø). En la actualidad está extendida en varios continentes después de las plantaciones realizadas en Australia (Nicholls et al., 1963), California (USA) (Rehder, 1940), Grecia (Matziris, 1982), Nueva Zelanda (Sweet y Thulin, 1962) y Sudáfrica (Duff, 1928; Rycroft y Wicht, 1947).

Su aparición espontánea se sitúa en territorios que, desde la antigüedad, han estado ocupados por sucesivas civilizaciones y en los que la acción del hombre hizo variar sustancialmente el paisaje vegetal. En unos casos impidió la evolución de la cubierta arbórea al mantener y extender el pinar, y en otros casos, redujo o fragmentó el primitivo territorio mediante sucesivas talas, fuegos y roturaciones del terreno. El resultado final sería la actual distribución discontinua de *P. pinaster* (Fig. 1.1).

La rusticidad de la especie ha propiciado su elección para la fijación de dunas y la repoblación de terrenos, generalmente arenosos, empobrecidos por la erosión (Moore, 1988). La reforestación con *P. pinaster* ha hecho posible la recuperación para el bosque de zonas antiguamente forestadas (Braganca y Havel, 1987), ya fuera por el propio *P. pinaster* o por frondosas climáticas. Esta extensiva utilización, dentro o fuera de su área natural, dificulta la posibilidad de precisar el carácter cultural de muchas de las actuales masas y conformar su área de distribución espontánea (Fig. 1.1). Por ello, determinar si las actuales poblaciones de *P. pinaster* son o no autóctonas es un trabajo bastante especulativo y el área natural debe circunscribirse a aquellas que hayan mantenido una continuidad histórica.

El centro de diseminación de la especie se situaría en "un sector de montañas medias de la Península Ibérica, en la confluencia de los climas mediterráneo y atlántico" (Mirov, 1967; Destremau et al., 1982). En la Península Ibérica es donde se encuentran las masas más importantes de *P. pinaster* con nítido carácter espontáneo (Ceballos et al., 1966; Nicolás y Gandullo, 1967). Dentro del territorio español, las masas naturales de esta

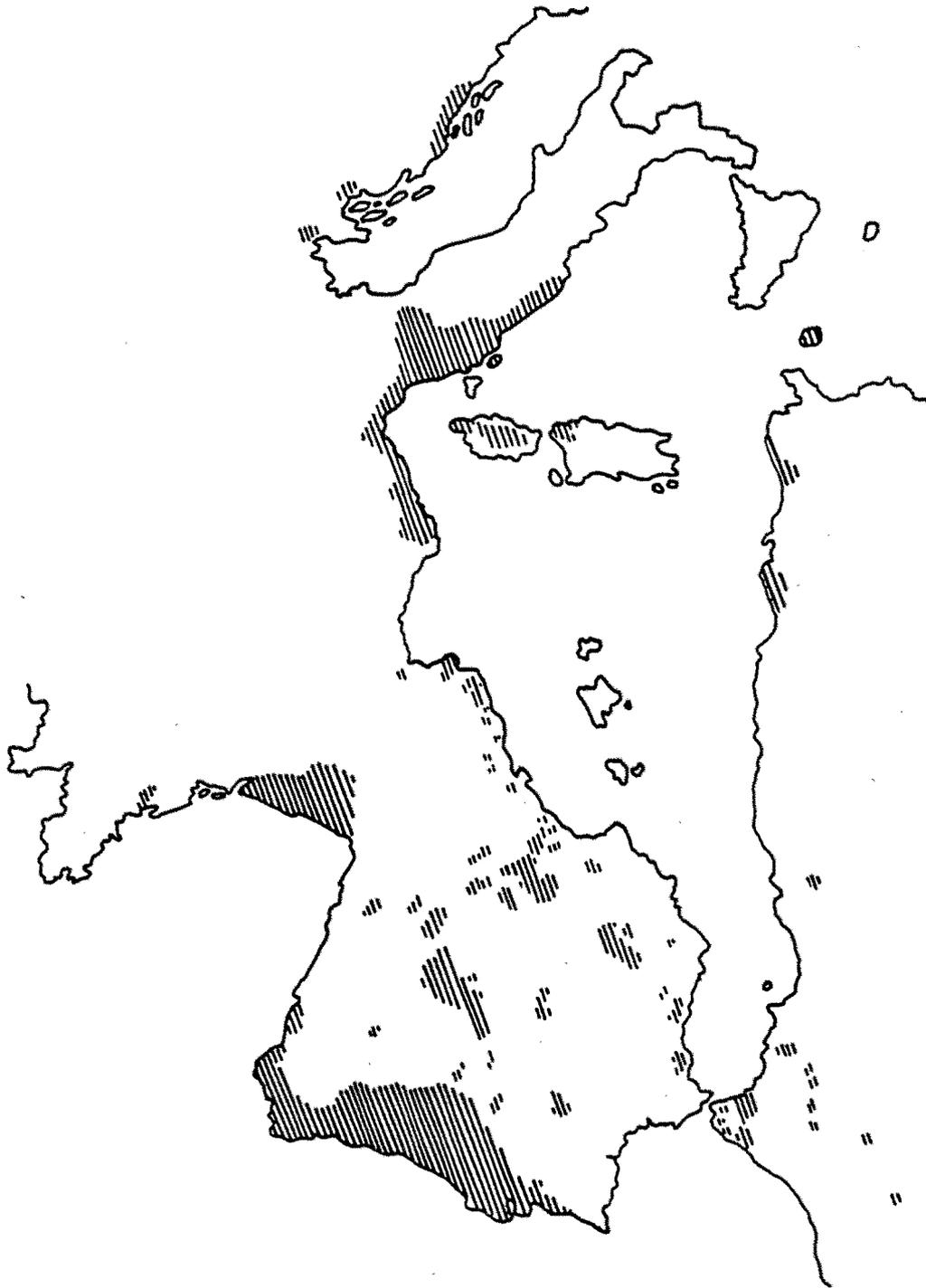


Fig 1.1 - Distribución de *Pinus pinaster* Ait. en su área natural (Mirov, 1967; Destremau, 1982; Bolos y Vigo, 1984).

especie ocupan del orden de 600.000 ha y las repoblaciones realizadas en los últimos cuarenta años sobrepasan las 800.000 ha (Gil *et al.*, 1990).

A partir del Sistema Ibérico, donde muestra una alta diversidad y se encuentra bien representado desde Burgos hasta Valencia, se extiende a través del Sistema Central hasta llegar a las costas atlánticas y colonizar los suelos arenosos de toda la franja litoral, desde la península de Setubal al estuario del río Garona. Sin embargo, esta franja litoral está actualmente interrumpida en gran parte de la costa cantábrica. Su límite septentrional se encontraría en el bosque de Coubre y las Landas de Gascuña, donde a principios del siglo XVIII estaba reducido a poco menos de 10.000 Ha localizadas principalmente sobre las dunas litorales. Hoy en día, y como resultado de las repoblaciones realizadas en la segunda mitad del siglo XVIII y del XIX, constituye un bosque artificial monoespecífico de más de un millón de hectáreas y una de las masas forestales continuas de mayor extensión del mundo (Scott, 1962).

Partiendo de la confluencia del Sistema Ibérico con el litoral Valenciano, se extiende a orillas del mediterráneo favorecido por los sistemas montañosos litorales. Hacia el norte se presenta en masas aisladas en Cataluña (Bolòs y Vigo, 1984), forma extensos pinares en el Var y Alpes Marítimos y penetra en la Península Italiana por la Liguria hasta llegar a la Toscana (Agostini, 1968; Gambi, 1983). Su presencia insular se centra fundamentalmente en Córcega y en el extremo norte de Cerdeña (Desole, 1960). Hacia el sur desciende por las cordilleras Bética y Penibética, pasando al norte de Africa donde se presenta muy fragmentado y discontinuo. Se encuentra principalmente en Marruecos (Destremau, 1974), llegando hasta el Alto Atlas donde tiene su límite meridional y altitudinal (2050 m). Con pequeñas masas en Argelia y Túnez (Destremau *et al.*, 1976), alcanza su extremo oriental en la isla de Pantelleria.

Según los datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (M.A.P.A., 1988), las repoblaciones efectuadas con *P. pinaster* hasta el año 1987 representan el 25 % del total de la superficie repoblada por acción directa de la Administración y la superficie total de monte alto ocupada por *P. pinaster* en España es de 1.505.000 Ha; lo cual representa el 20 % del total de la superficie forestal destinada a la producción de madera y el 28 % de todas las coníferas.

Cerca del 60 % de esta superficie se concentra en el Noroeste del territorio peninsular español. Aunque muchas de estas últimas poblaciones han sido sustituidas recientemente por plantaciones de *Eucalyptus*, *P. pinaster* es sin duda la especie más extendida e importante dentro de la producción forestal española (Gil *et al.*, 1990).

Características.

Pinus pinaster es poco exigente y muy adaptable a las variaciones de suelo y clima. Su característica principal es la de ser una especie pionera o colonizadora de espacios vacíos, ocupando las primeras etapas de la sucesión hacia formaciones más diversificadas. Sus escasas exigencias y la rapidez con que se desarrolla le permiten colonizar suelos desnudos, donde aún no hayan podido instalarse otras especies. Por este motivo se ha utilizado con gran éxito para la fijación de dunas, la protección del suelo frente a la erosión (Moore, 1988) y la recuperación de zonas forestales (Braganca y Havel, 1987). Por otro lado, no puede regenerarse, o implantarse espontáneamente, más que en suelos casi desprovistos de vegetación, en los que sus semillas puedan caer directamente sobre el suelo mineral.

Como otros pinos, está adaptado a convivir con el fuego y para ello ha desarrollado una gran proporción de corteza, una fructificación precoz y un gran reservorio de semillas, almacenadas en las piñas cerradas de las copas de los árboles. Sus semillas, con un gran poder de diseminación, germinan perfectamente sobre un suelo calcinado y las plántulas de *P. pinaster* aventajan al resto de la vegetación debido a su rápido crecimiento.

Se le considera una especie de suelos arenosos y ácidos, y por tanto calcífuga; pero también se puede encontrar en suelos muy arcillosos e incluso suelos muy calcáreos (Ceballos, 1933; Huguet del Villar, 1933; Nicolás y Gandullo, 1967). Como otras especies, prefiere suelos ricos, ligeros y profundos (Schafer, 1988), con una buena disponibilidad de agua. No obstante, una de las características más importantes de este pino es su tolerancia a los suelos de escasa fertilidad, en los que pueden desarrollarse muy pocas especies forestales de interés económico (Scott, 1962). Esta característica, y la ocupación espontánea de las zonas más fértiles por

especies con las que se encuentra en desventaja competitiva, lo han relegado a zonas relativamente pobres.

La fracción horizontal del sistema radical de *P. pinaster* se desarrolla mucho mejor en suelos fácilmente penetrables. Por este motivo, crece mejor en suelos arenosos que en suelos limosos o arcillosos. La fracción vertical de su sistema radical presenta un gran poder de penetración y puede adaptarse a la presencia de un horizonte compacto siempre que no se encuentre demasiado cerca de la superficie del suelo. Su sistema absorbente funciona mejor en un medio ácido, de pH 5 e incluso inferior (Maugè, 1987).

Puede vivir sobre suelos con solo trazas de elementos nutritivos, como sucede en las dunas de Aquitania (Chaperon, 1986). Las raíces de *P. pinaster* parecen capaces de extraer los elementos nutritivos del suelo con una gran eficacia, incluso bajo formas inaccesibles a la mayoría de vegetales (Maugè, 1987). Por otra parte, responde de forma notable a la fertilización (Bonneau et al., 1973; Gelpe y Guinaudeau, 1974; Maugè, 1973, 1974; Otha et al., 1985). En la mayoría de los casos el elemento limitante es el fósforo, aunque en los suelos muy arenosos, donde la corrección por aporte de fertilizantes resulta casi imposible, la limitación principal se presenta por la carencia de nitrógeno (Maugè, 1987).

Es difícil generalizar las características del comportamiento de la especie en conjunto frente a los distintos factores climáticos. Este comportamiento está profundamente influenciado por la constitución genética del individuo y varía según la procedencia. Todas las razas estudiadas soportan sin dificultades las altas temperaturas (más de 40° C), pero el comportamiento frente a las bajas temperaturas difiere mucho entre las razas del norte, más resistentes al frío (llegando a superar períodos de hasta -25° C), y las del sur, muy sensibles a las bajas temperaturas (Bouvarel, 1960; Illy, 1966). Los daños producidos por el frío no solo afectan a las hojas, sino también al cambium y al sistema radical, por lo que los síntomas pueden manifestarse más tarde, cuando el árbol haya agotado todas sus reservas. Otro efecto importante de las bajas temperaturas es la ralentización del crecimiento y la mayor susceptibilidad al ataque de los parásitos y patógenos. Estos fenómenos pueden llevar a la desaparición progresiva de plantaciones enteras después de un período de frío extremo.

En términos generales, *P. pinaster* es poco sensible a la cantidad y al reparto de la pluviometría, aunque las procedencias de Las Landas y el Noroeste de la Península Ibérica son menos resistentes al estrés hídrico que las procedencias del Sur de la Península Ibérica y el Norte de Africa (Guyon y Kremer, 1982; Sarrauste, 1982; Nguyen, 1986). La resistencia al déficit hídrico que presentan las razas del sur está determinada por su menor tasa de transpiración, la protección cerosa de sus acículas y una mayor proporción de biomasa radical. De todas formas, el crecimiento se ve muy afectado si no dispone de una cantidad suficiente de agua, y por tanto de nutrientes en solución, durante los períodos de vegetación activa. Los períodos de sequía suelen venir acompañados por una baja higrometría en el aire. La planta reacciona a esta baja humedad ambiental cerrando sus estomas (Loustau y Moussa, 1989), lo cual reduce el consumo de agua pero bloquea el intercambio gaseoso y por tanto la fotosíntesis. Por este motivo, las sequías estivales y otoñales provocan una gran reducción en el crecimiento, especialmente en suelos arenosos con baja capacidad de retención.

Regeneración natural y regeneración artificial.

La regeneración natural de *P. pinaster* es difícil (Chaperon y Callmail, 1988). Como se ha mencionado antes, la germinación de las semillas de esta especie se ve favorecida en un suelo mineral, desprovisto de vegetación o con una cubierta vegetal escasa.

Sus plántulas son heliófilas y la permanencia de sus formaciones requiere la pérdida de la cubierta arbórea. En una zona de características edafoclimáticas favorables, el pinar crecerá hasta cerrar sus copas, impidiendo de esta forma su propia regeneración e iniciando la evolución hacia formaciones más diversificadas. El pino permanecería en zonas donde la precipitación, el substrato o el relieve resultaran limitantes para otras especies arbóreas y volvería a extenderse cuando el fuego dejara lugares vacíos (Gil *et al.* 1990).

Los largos períodos de sequía que se producen en nuestras latitudes entre la primavera y el otoño, abortan la elongación radical de las semillas que hayan logrado germinar, al no encontrar el suministro de agua que les

es necesario. No obstante, es posible encontrar abundantes plántulas de regeneración natural en plantaciones jóvenes, donde la desecación de las capas superficiales del suelo es menos rápida, aunque es poco probable que esta regeneración produzca plantas de buena calidad, ya que la mayoría de los plantones habrán sufrido la competencia de los individuos adultos durante un largo período de tiempo.

Por tanto, la regeneración artificial es totalmente necesaria si se pretende obtener una repoblación de suficiente calidad.

Utilización de la madera de *P. pinaster*.

Contrariamente a algunas opiniones, la madera de *P. pinaster* es aplicable a casi todos los usos y sus características mecánicas son equivalentes a las de otras resinosas. Las razones de su mala reputación son sobretodo históricas (Maugè, 1987). Desde la antigüedad y hasta muy recientemente, el principal producto obtenido de esta especie era la resina. Los árboles se mantenían en plantación durante 80 o más años, mientras su resinación resultaba rentable. Cuando se decidía talarlos, para liberar el suelo y permitir la implantación de una nueva generación, había ya tiempo que los troncos presentaban fenómenos de putrefacción interior y los primeros metros estaban totalmente deformados por las heridas. Los árboles que no eran buenos productores de resina eran invariablemente eliminados en las primeras entresacas, sin tener en cuenta si se trataba de individuos rectos y vigorosos. Con este tipo de manejo era muy difícil obtener buena madera de construcción.

Con la producción de parqué se abrió una salida original y revalorizadora para esta madera que hizo cambiar la actitud de productores, industriales y consumidores. Los campos de aplicación de la madera de *P. pinaster* han conocido una evolución espectacular durante los últimos 50 años (Chaperon, 1986). Los productos obtenidos a partir de las mejores calidades de madera de *P. pinaster* se utilizan para el maderaje de edificios y construcciones, paneles de contraplacado, parqués y molduras. Las principales características a satisfacer son la rectitud de los troncos y, especialmente, la ausencia de nudosidad excesiva. La madera que no cumple

estas exigencias tiene su principal salida en la producción de pasta de celulosa para la industria papelera (Cailleau, 1984).

La carbonización, la destilación de las acículas para la obtención de aceites esenciales utilizados en fármacos y cosméticos, la calefacción doméstica o industrial y el compostage de la corteza para su uso como substrato en la producción hortícola y viverística, son aplicaciones muy limitadas y con pocas posibilidades de expansión, pero que permiten el aprovechamiento de los subproductos de desecho.

Origen del material vegetal y producción de planta para reforestación.

El origen del material vegetal empleado para realizar la repoblación puede ser diverso. El árbol puede provenir de la siembra directa de una semilla, o de la plantación de una planta producida en vivero, procedente a su vez de una semilla o de una estaquilla. La utilización de un tipo u otro de material vegetal esta ligado al nivel de intensificación del cultivo. Cuanto más intensivo, mayor es el interés en escoger material vegetal genéticamente seleccionado con vistas a rentabilizar las inversiones hechas en los trabajos de reforestación. La elección del nivel de intensificación del cultivo depende del objetivo que se persiga y de las condiciones del medio. Un suelo pobre o un medio hostil a la especie con un alto riesgo de daños producidos por patógenos o parásitos, aconsejaría la utilización de técnicas más extensivas, reservando las técnicas intensivas a los medios más favorables, en los que se pretendan obtener altas producciones de madera de buena calidad.

El método más empleado para la repoblación con *P. pinaster* ha sido la siembra directa de semillas, a la que se ha dedicado más del 93,5 % del total de semilla consumida para esta especie (Pardos y Gil, 1984). En este tipo de repoblaciones, la cantidad de semilla inicialmente recomendada era de 10 a 15 kg/ha (Ramos, 1981), aunque habitualmente se llegaron a usar entre 20 y 25 kg/ha. La evolución de las técnicas de preparación del suelo ha reducido el aporte de semillas a 2 ó 3 kg/ha (Maugè, 1987).

La futura utilización de la especie implica que las plantaciones deben realizarse con plantas genéticamente mejoradas para obtener: mayor capacidad de producción de madera, mayor rectitud del tronco, mayor tolerancia a las bajas temperaturas y menor susceptibilidad a determinados

patógenos (Illy, 1966; Chaperon, 1980; Alazard, 1983; Kremer y Lascoux, 1988). La disponibilidad de material genético con estas características no será ilimitada y por tanto habrá que recurrir a métodos que permitan un mejor aprovechamiento de la semilla, tales como la utilización de plantas producidas en vivero para el establecimiento de plantaciones.

La producción de plantas en vivero se diversifica en dos grandes modalidades: a raíz desnuda y en contenedor. La producción a raíz desnuda ofrece buenos resultados cuando las plantas poseen un diámetro de cuello suficiente, una relación adecuada entre su parte aérea y su parte radical y un sistema radical equilibrado y no deformado (Ritchie, 1984).

Las prácticas culturales aplicadas durante la fase de producción en vivero afectarán tanto al desarrollo inicial de los plantones como a su posterior comportamiento en campo (Barnett, 1984; Duryea, 1984; Duryea y McClain, 1984). Por ello, el emplazamiento del vivero ha de ser convenientemente elegido (Morby, 1984) atendiendo al clima, el tipo de suelo (preferentemente ligero y bien drenado) (Eavis, 1972; Davey, 1984; Warkentin, 1984), la topografía (suelo llano) y la calidad del agua (ligeramente ácida) (Landis, 1982; Day, 1984). Antes de la siembra se procede a la eliminación de la vegetación existente, la fertilización de fondo (50 u.N, 150 u.P, 150 u.K / ha) (Driessche, 1984), y la preparación y desinfección (con Metam-sodio, Dazomet o Bromuro de metilo) de los bancales de siembra (Thompson, 1984). La siembra suele realizarse a principios de primavera, a una densidad de 80-100 plantas por m² (11 x 11 cm). A partir de ese momento habrá que asegurar un riego regular (McDonald, 1984) y una fertilización adecuada (Fisher y Mexal, 1984). El control de malas hierbas puede realizarse por vía química a partir del momento en que las plantas estén suficientemente desarrolladas (6-8 cm), asegurando la selectividad del herbicida (Hexazinona 800 g/ha) (Owston y Abrahamson, 1984).

A finales de agosto, las plantas pueden haber alcanzado una altura suficiente (12-15 cm) para permitir una poda mecánica de su raíz (a 6 cm de profundidad) y estimular la ramificación del sistema radical (Duryea, 1984). En general, una sola poda puede ser suficiente, pero un buen crecimiento justificaría una segunda poda a finales de septiembre. Esta técnica de producción permite obtener plantas de buena calidad en una sola estación vegetativa y con un precio muy bajo.

A partir de mediados de noviembre las plantas pueden ser cosechadas mecánicamente, con la precaución de respetar al máximo su integridad radical (Burdett y Simpson, 1984). Si se precisa un período largo de almacenaje antes de su trasplante a campo, las plantas deben ser conservadas a 2°C y protegidas en una bolsa de papel parafinado o polyetileno. Protección que les permitirá también soportar el transporte desde el vivero a la plantación. En el momento del trasplante es necesario recortar el sistema radical de las plantas, dejándolo a una longitud de 10 cm, para evitar deformaciones radicales en el proceso de plantación.

La producción de plantas en contenedor precisa algunos cambios en la organización y las técnicas del vivero (Tinus y McDonald, 1979). En primer lugar, es muy importante la elección de un contenedor con un volumen adaptado al nivel de desarrollo de la planta que se produce y que, si no es permeable a las raíces, presente una forma y un diseño interior que eviten la espiralización y deformación del sistema radical (Ben Salem, 1971; Hiatt y Tinus, 1974). Este sistema de producción permite variar el contenido en nutrientes y la composición del substrato de cultivo, adecuándolo a las características fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de la planta (Richards *et al.*, 1964; Brix y Driessche, 1974; Phipps, 1974). La zona de producción debe estar dotada de un sistema de irrigación que permita el riego diario durante los meses de verano y de un sistema de protección frente a la radiación solar directa, que provocaría problemas de evapotranspiración excesiva y elevación de la temperatura del substrato. La desinfección del substrato de cultivo resulta más sencilla y efectiva que en el caso de la producción a raíz desnuda, contribuyendo a un mejor estado sanitario de las plantas. La individualización de las plantas producidas en contenedor facilita tanto el control fitosanitario, al impedir la rápida dispersión de posibles patógenos radicales, como una mejor dosificación de la fertilización.

A pesar de que muchos de estos sistemas y procesos pueden mecanizarse y automatizarse, la producción en contenedor resulta más costosa que la producción a raíz desnuda. La contrapartida viene dada por la mayor rapidez en la producción (Stein, 1974) y la mejor calidad de la planta producida en contenedor (Barnett, 1984), que repercute en una mayor supervivencia al trasplante y un mayor crecimiento durante los primeros

años en campo (Tinus y Owston, 1984; Chaperon y Callmall, 1988), reflejo de la diferencia entre plantar con el sistema radical intacto o con un sistema radical parcial (Barnett, 1980). Este efecto se hace más patente cuanto menos favorables sean las condiciones edafoclimáticas de la zona de plantación (Chaperon, 1986).

Como se ha mencionado anteriormente, la adaptabilidad de *P. pinaster* y su tolerancia a los suelos pobres, han determinado su uso para la repoblación de muchas zonas marginales. Por tanto, los efectos beneficiosos de la producción en contenedor encontrarían un buen campo de aplicación en las repoblaciones con *P. pinaster*, generalmente realizadas en zonas de condiciones poco favorables al crecimiento.

La producción en contenedor es una buena alternativa en aquellos casos en que las características del vivero, en especial el tipo de suelo, estén lejos del óptimo necesario para la planta que nos interese producir, o bien cuando se utilice material vegetal de alto valor genético, que haga justificable el uso de técnicas más intensivas con vistas a su óptimo aprovechamiento, como por ejemplo: semillas seleccionadas procedentes de huertos semillero, estaquillas obtenidas de plantas madre de clones seleccionados o plantas obtenidas incluso por micropropagación clonal *in vitro* (Rancillac, 1981).

En definitiva, la producción de plantas a raíz desnuda es una técnica económica que predomina en las regiones templadas y es utilizada especialmente cuando las condiciones de plantación son favorables. En cambio, las plantas producidas en contenedor soportan mejor las condiciones adversas de los procesos de transporte y plantación que suelen darse en las regiones tropicales cálidas (África, Brasil, Sudeste Asiático), secas (como toda la zona mediterránea), o al contrario, excesivamente frías (Canadá, Escandinavia).

Silvicultura.

El establecimiento de una masa forestal empieza con la eliminación de la vegetación y la preparación del terreno antes de la siembra de semillas o la plantación de plantones de *P. pinaster* producidos en vivero. Durante los primeros años es necesario el control de la vegetación herbácea que

inevitablemente se establece en la plantación. Esta eliminación, hecha por medios físicos, manuales o mecánicos, o por medios químicos, con la aplicación de herbicidas selectivos, reduce la competencia por los nutrientes y el agua y permite un mejor crecimiento y establecimiento de la plantación (Gjerstad *et al.*, 1984). Entre el tercer y cuarto año de crecimiento, cuando las plantas han alcanzado 1.5 m de altura, se procede a una primera reducción de la densidad de plantación. En esta operación se eliminan selectivamente los individuos defectuosos y menos vigorosos, dejando una distancia de 4 m entre filas y un espacio medio de 1 m entre árboles. Posteriormente, cuando las plantas alcanzan los 3-4 m de altura se realiza una segunda reducción de la densidad, seleccionando los mejores individuos y dejando un marco medio de 4 x 2 m. Estas operaciones permiten un normal crecimiento de los árboles y la eliminación de los individuos con defectos de crecimiento o problemas fitopatológicos. El establecimiento de la plantación con plantas producidas en vivero elimina, total o parcialmente, la necesidad de tales reducciones de densidad, ya que generalmente el marco de plantación inicial se establece a 4 x 1 ó 4 x 2 m. Durante el crecimiento posterior de la plantación, y según vaya aumentando la circunferencia de los árboles, se irán realizando hasta 4 sucesivas reducciones de densidad. Estas entresacas, a diferencia de las anteriores, ya producen elementos comercializables, iniciándose con ello el rendimiento y explotación de la plantación. La poda de las ramas inferiores o muertas es otra práctica silvícola aconsejable en el mantenimiento de una plantación de *P. pinaster*, ya que disminuye la nudosidad de la madera y aumenta su valor comercial. La tala final se realiza a los 40 ó 50 años de la plantación, cuando la circunferencia de los troncos ha alcanzado los 120 ó 130 cm.

En muchas zonas geográficas y climáticas, los suelos más fértiles y propicios al cultivo se dedican generalmente a la agricultura y la producción forestal suele quedar reservada a suelos menos favorables o a zonas de montaña con pendientes pronunciadas o limitaciones climáticas. Estas características imponen una gran economía de medios a los intentos de corrección de los factores limitantes. Cualquier inversión forestal es a largo plazo y la más pequeña actuación implicará grandes superficies, a menudo heterogéneas y de difícil acceso. Por todo ello, uno de los grandes objetivos de la investigación forestal se centra en el desarrollo de técnicas que

permitan mejorar el crecimiento de los árboles sin la utilización de prácticas costosas o contaminantes, tales como el aporte de fertilizantes o la utilización de pesticidas y herbicidas.

La simbiosis ectomicorrícica.

Micorrizas en las especies forestales: efectos sobre la planta e importancia en el ecosistema.

Prácticamente todas las plantas terrestres (el 95% de las especies conocidas) se caracterizan por establecer, de forma natural y constante, una simbiosis a nivel radical con una serie de hongos del suelo. Esta simbiosis hongo-raíz se denomina micorriza (Marks y Kozlowski, 1973; Sanders *et al.*, 1975; Marx y Krupa, 1978; Ruehle y Marx, 1979; Harley y Smith, 1983; Powell y Bagyaraj, 1984; Le Tacon, 1985; Strullu, 1985; Richards, 1987). Los tipos de micorrizas dominantes entre las especies forestales son: 1) las ectomicorrizas, formadas por una 450 especies vegetales y entre las que se incluyen casi todos los miembros de las importantes familias *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae*, *Salicaceae* y *Tiliaceae* y algunos de las *Ericaceae*, *Juglandaceae*, *Leguminosae* y *Mirtaceae* (Meyer, 1973; Newman y Reddell, 1987); y 2) las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) comunes entre géneros como: *Acer*, *Fraxinus*, *Liquidambar*, *Liriodendron*, *Platanus*, *Prunus*, *Sequoia* y *Thuja* y de gran importancia para la mayoría de las plantas de interés agrícola (Mosse y Hayman, 1980). Algunos géneros de utilización forestal: *Alnus* (Rose, 1980), *Cupressus* (Meyer, 1973), *Eucalyptus* (Malajczuk *et al.*, 1981; Lapeyrie y Chilvers, 1985;), *Juglans*, *Juniperus* (Meyer, 1973), *Malus* (Meyer, 1973), *Populus* (Vozzo y HacsKaylo, 1974), *Pyrus* (Meyer, 1973), *Quercus* (Grand, 1969; Rothwell *et al.*, 1983) y *Salix* (Meyer, 1973), aceptan ambos tipos de simbiosis.

Las ectomicorrizas se desarrollan en las raíces cortas y absorbentes del sistema radical y pueden reconocerse por la característica cubierta

fúngica o manto que las envuelve. Frecuentemente el micelio fúngico se extiende desde el manto y coloniza el suelo o el substrato de enraizamiento circundante. Si se examina la anatomía interna de una ectomicorriza se encuentra otra estructura característica de esta simbiosis, la red de Hartig, es decir, el crecimiento intercelular del hongo entre las células corticales de la raíz (Kottke y Oberwinkler, 1986, 1989; Marks, 1991). En esta extensa zona de contacto entre el micelio y las células del córtex radical es donde se produce el intercambio de nutrientes y agua entre el hongo y la planta. El hongo transporta y libera al huésped agua y nutrientes, recibiendo a cambio azúcares y otros productos de la fotosíntesis (France y Reid, 1983; Harley y Smith, 1983).

Los hongos formadores de ectomicorrizas se encuentran principalmente entre los Basidiomicotina (*Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Hymenogaster*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma*,...) y Ascomicotina (*Balsamia*, *Elaphomyces*, *Genea*, *Tuber*,...) e incluyen muchas de las especies, tanto epigeas como hipogeas, comunes en los bosques (Trappe, 1962; Miller, 1982, 1983).

El aspecto estructural de una ectomicorriza está determinado tanto por el hongo como por la planta huésped. Miles de hongos distintos pueden formar ectomicorrizas, y muchos de ellos con más de una planta huésped, por lo que la apariencia externa y la morfología de las distintas combinaciones hongo-planta puede variar enormemente (Dominik, 1969; Zak, 1973; Ingleby, *et al.*, 1990). Con frecuencia, la morfología ectomicorrícica es característica para un determinado género de plantas huésped. Así, en los pinos, las ectomicorrizas se bifurcan dicotómicamente hasta poder formar complejas estructuras coraloides. En otras especies las ectomicorrizas adoptan formas cilíndricas simples, pinnadas, o incluso formaciones tuberculares compactas. La cantidad de micelio que se extiende desde el manto de la ectomicorriza, es otro importante carácter distintivo. Este micelio externo puede ser desde muy escaso, casi invisible, hasta una densa red con cordones de hifas y rizomorfos (Read, 1984).

Los primeros trabajos experimentales, realizados a principios de siglo, demostraron que las plantas micorrizadas no solo eran mayores en tamaño que las no micorrizadas, sino que además contenían mayores cantidades de los principales nutrientes por unidad de masa (Hatch, 1937). Las

ectomicorrizas no solo aumentan la absorción de macronutrientes, sino que disminuyen la toxicidad debida a la presencia de metales pesados, como: aluminio, cadmio, cobre, molibdeno, níquel y zinc (Wilkins, 1991)

Para dar explicación a este fenómeno se han propuesto distintas hipótesis. En primer lugar, el hongo asociado a la raíz produce hifas externas que incrementan la superficie de absorción y permiten acceder a nutrientes que, sino, quedarían fuera de la zona de influencia rizosférica (Hatch, 1937; Kramer y Wilburg, 1949; Harley y McCready, 1952; Melin y Nilsson, 1958). Por otro lado, el simbionte fúngico incrementa la eficiencia en la absorción de fósforo, permitiendo a la planta la utilización de algunas fuentes orgánicas e inorgánicas inaccesibles para las plantas no micorrizadas (Theodorou, 1968; Mejsirik y Krause, 1973; Williamson y Alexander, 1975). Los hongos ectomicorrícicos son capaces de acumular fósforo en forma de gránulos de polifosfato en el interior de vacuolas (Strullu *et al.*, 1983; Martin *et al.*, 1985) y movilizarlo rápidamente cuando es requerido, con lo que el manto ectomicorrícico se convierte en un potencial órgano de reserva para la planta huésped (Chilvers y Harley, 1980; Lapeyrie *et al.*, 1984). La transferencia de fósforo a la planta está probablemente acoplada a la transferencia de carbohidratos al hongo y debe realizarse a través de la red de Hartig, organizada en una estructura cenocítica en contacto directo con las células del córtex radical, que facilita la transferencia bidireccional de iones y moléculas (Kottke y Oberwinkler, 1986).

El nitrógeno es el factor limitante del crecimiento más importante en los sistemas forestales (Kramer y Kozlowski, 1979). Las ectomicorrizas estimulan la asimilación de nitrógeno, tanto en forma de nitrato y amonio (Carroodus, 1966, 1967; Rygliewicz *et al.*, 1984a, b; Plassard *et al.*, 1985, 1991; Martin *et al.*, 1986) como en forma de compuestos simples con grupos amino (Melin y Nilsson, 1953; Stribley y Read, 1980) e incluso a partir de compuestos orgánicos nitrogenados, que constituyen la fuente principal de este nutriente en los suelos forestales (Abucinadah y Read, 1986). Se han propuesto algunos mecanismos enzimáticos a través de los cuales el hongo ectomicorrícico estaría implicado en el metabolismo del nitrógeno (France y Reid, 1983; Martin *et al.*, 1983; Plassard *et al.*, 1985), pero la translocación entre el hongo y la planta huésped aún no está totalmente explicada.

La infección ectomicorrícica no solo produce un incremento en el contenido de nutrientes de la planta, sino que también puede aumentar la absorción de agua. El micelio fúngico y algunas de sus estructuras especializadas, como las rizomorfas, juegan un importante papel en el transporte de agua y nutrientes (Skinner y Bowen, 1974a, b; Dudridge *et al.*, 1980; Read, 1984; Boyd *et al.*, 1985; Cairney, 1992) y las plantas asociadas a simbiontes ectomicorrícicos capaces de formar estas estructuras (*Rhizopogon*, *Pisolithus*,...) son más tolerantes al estrés causado por la sequía (Theodorou y Bowen, 1970; Reid, 1979; Parke *et al.*, 1983; Dixon *et al.*, 1983).

Muchos hongos ectomicorrícicos proporcionan a la planta vitaminas, como la biotina, la tiamina y el ácido pantoténico, y producen compuestos reguladores del crecimiento vegetal, como auxinas, citoquininas, etileno y giberilinas (Slankis, 1973; Graham y Linderman, 1980; Ho y Trappe, 1987). Estos compuestos afectan a la morfogénesis del sistema radical micorrizado (Ulrich, 1960; Gay *et al.*, 1982), pero la correlación entre la capacidad de liberación de estos compuestos y su efecto sobre la planta huésped aún no ha quedado totalmente determinada.

Los hongos ectomicorrícicos ocupan un nicho ecológico de vital importancia en la biología del suelo y establecen una serie de complejas relaciones con otros microorganismos de la rizosfera (Linderman, 1988; Ingham y Molina, 1991). Estas interacciones varían desde la mutua estimulación (Oliveira y Garbaye, 1989) y la incorporación de bacterias fijadoras de nitrógeno a la estructura de la micorriza (Li y Hung, 1987), hasta el antagonismo mediante la competición por nutrientes y fenómenos de antibiosis y fungistasis (Zak, 1964).

Esta capacidad antagonista, hace de muchos hongos ectomicorrícicos, potenciales agentes de control biológico frente a determinados patógenos radicales comunes en los viveros forestales (*Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Rhizoctonia*) (Marx, 1972; Sinclair *et al.*, 1982; Duchesne *et al.*, 1989; Perrin, 1991). Los mecanismos implicados en este papel protector son múltiples y se han propuesto una serie de posibilidades. El manto ectomicorrícico y la red de Hartig pueden representar una barrera física a la penetración del patógeno (Marx, 1973), y los hongos ectomicorrícicos pueden producir metabolitos de actividad antibiótica y fungistática (Graham

y Linderman, 1980; Sampangi y Perrin, 1985). El efecto se puede producir también por una vía indirecta, dificultando el establecimiento del patógeno en la rizosfera mediante cambios cualitativos y cuantitativos en los exudados de las raíces micorrizadas (Malajczuk y McComb, 1977), y estimulando la presencia en la rizosfera de poblaciones microbianas antagonistas al patógeno (Malajczuk y McComb, 1979).

En el conjunto del ecosistema forestal, las ectomicorrizas tienen un importante papel en la renovación de la biomasa y los ciclos de nutrientes (Fogel y Hunt, 1979; Vogt *et al.*, 1982), e intervienen directamente en las relaciones de competencia que se establecen entre las plantas por la captación de nutrientes y agua (Perry *et al.*, 1989). Por un lado son capaces de explorar los micronichos ricos en nutrientes que existen en la heterogeneidad del suelo forestal, movilizándolo y trasladándolo al vegetal elementos nutritivos que, de otra forma, le serían inaccesibles (St. John y Coleman, 1983). Por otro lado, a través de los cordones miceliales y las rizomorfas de las micorrizas, se produce un trasvase, de agua, elementos minerales y productos de la fotosíntesis, entre árboles vecinos (Reid y Woods, 1969; Brownlee *et al.*, 1983; Finlay y Read, 1986a, b). Esta interconexión subterránea, a través del simbiote fúngico, equilibra el ecosistema y hace del bosque algo más que la yuxtaposición de árboles aislados.

La integración de los hongos micorrícicos en el ecosistema forestal no está solo ligada a las especies arbóreas. Muchos animales dependen de las fructificaciones de estos hongos para su nutrición, y a su vez, muchos hongos ectomicorrícicos dependen de pequeños mamíferos para la dispersión de sus esporas (Fogel y Trappe, 1978; Maser *et al.*, 1978, 1985; Kotter y Farentinos, 1984a, b; Malajczuk *et al.*, 1987; Blaschke y Bäumlér, 1989).

Finalmente, varios autores sostienen que la simbiosis entre hongos y vegetales surgió en distintos grupos y en distintos tiempos durante la evolución (Marks, 1991). Según varias hipótesis, estas simbiosis habrían permitido la colonización de los ecosistemas terrestres y la aparición de las plantas vasculares (Pirozynski y Malloch, 1975), la evolución hacia formas arborescentes (Pirozynski, 1981), el desarrollo de los vegetales hacia estrategias de vida perenne (Trappe, 1987) y las diferencias en la composición de los bosques (Malloch *et al.*, 1980; Pirozynski, 1981).

Aplicación de la micorrización controlada en la producción de planta para reforestación.

En todas las comunidades forestales un mismo árbol puede estar asociado a numerosas especies fúngicas. La simbiosis múltiple es la situación más frecuente en condiciones naturales (Zak y Marx, 1964; Trappe, 1977), llegándose a producir una auténtica complementariedad funcional entre los distintos hongos del complejo micorrícico (López y Garbaye, 1990). Por otro lado, la composición específica de la comunidad de hongos ectomicorrícicos varía con el tiempo (Marks y Foster, 1967; Mason *et al.*, 1982, 1983; Deacon *et al.*, 1983; Last *et al.*, 1983; Le Tacon *et al.*, 1984; Dighton y Mason, 1985; Fleming *et al.*, 1986; Garbaye *et al.*, 1986; Last *et al.*, 1987). Las especies ectomicorrícicas que intervienen en los primeros estadios del crecimiento del árbol pertenecen esencialmente a los géneros: *Hebeloma*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Thelephora* (Trappe y Strand, 1969; Croghan, 1984). Más tarde y secuencialmente, se añaden a estos, sin reemplazarlos totalmente, una serie de especies que constituirán la micobiota del sotobosque forestal: *Boletus*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Lactarius*, *Russula*, *Tricholoma*, etc. Muchas de estas últimas especies presentan una reducida capacidad para colonizar las raíces de los plantones recién trasplantados (Danielson, 1988; Marx y Cordell, 1988). La diferencia en el comportamiento de las especies ectomicorrícicas puede estar determinada por distintos factores ligados al suelo, al microclima, al propio árbol y a las relaciones de competencia entre los hongos (McAfee y Fortin, 1986; Gibson y Deacon, 1990). Así, aquellos hongos que produzcan un gran número de propágulos de resistencia, fácilmente dispersables y capaces de sobrevivir durante largo tiempo, tendrán una ventaja adaptativa que les permitirá colonizar rápidamente las raíces de las nuevas plantas. La relativa capacidad saprofítica de algunas especies, les confiere la facultad de sobrevivir en el suelo en ausencia de la planta hospedadora y colocarse en una situación de ventaja para la colonización de futuros huéspedes. Por último, la receptividad de la planta a la simbiosis y la estructura físicoquímica de las capas superficiales del suelo evolucionan con el tiempo y son factores importantes en la sucesión de las especies de hongos ectomicorrícicos.

Generalmente, una misma especie vegetal puede formar una gran diversidad de asociaciones ectomicorrícicas con hongos de distinto origen filogenético (Trappe, 1962). No obstante, las especies de *Alnus* son ejemplos de plantas hospedadoras que solo forman micorrizas con un reducido número de especies fúngicas (Neal *et al.*, 1968; Molina, 1979a, 1981). Son pocos los hongos que están restringidos a una fuerte especificidad por la planta hospedadora. Los casos más conocidos son, tal vez, los de: *Alpova diplophloeus*, supuestamente restringido al género *Alnus*, *Leccinum aurantiacum*, asociado a *Populus tremula*, y *Suillus grevillei*, simblonte de distintas especies de *Larix*, aunque también se ha descrito en asociación con otras coníferas (Trappe, 1962; Linnemann, 1971). En el otro extremo encontramos especies como *Cenococcum geophilum* y *Pisolithus tinctorius*, capaces de formar ectomicorrizas con un gran número de géneros vegetales, pertenecientes tanto a las angiospermas como a las gimnospermas (Trappe, 1964; Marx, 1977).

El estudio de la especificidad ectomicorrícica ha llevado a establecer que determinados hongos solo fructifican asociados a una especie, género o familia vegetal. No obstante, se ha demostrado que esta especificidad ecológica no implica necesariamente que estas especies fúngicas estén restringidas a la formación de ectomicorrizas con dichas especies vegetales (Grand, 1968; Molina, 1979a, 1981; Molina y Trappe, 1982a).

Se puede concluir que la alta especificidad no es una característica común entre los hongos y las plantas ectomicorrícicas. Por tanto, en general una especie vegetal puede asociarse a una gran diversidad de simbioses fúngicas y viceversa.

El efecto sobre el crecimiento de la planta hospedadora varía según la especie fúngica asociada y las condiciones ambientales (Benecke y Gölb, 1974; Mitchell *et al.*, 1984). Además, para una misma combinación específica hongo-planta, la compatibilidad o infectividad varían con el origen genético o geográfico de los simbioses (Marx, 1981; Malajczuk *et al.*, 1990). Distintas cepas de una misma especie de hongo ectomicorrícico producen distintos efectos sobre el crecimiento de la planta (Lalho, 1970; Le Tacon y Bouchard, 1986; Perry *et al.*, 1987). Por tanto, todo programa de micorrización controlada debe afrontar la elección de la cepa o especie fúngica a utilizar.

La selección del hongo ectomicorrícico para la inoculación de las plantas en el vivero, es sin duda uno de los aspectos más importantes de la aplicación de la tecnología micorrícica en la producción forestal (Bowen, 1965; Mikola, 1973; Trappe, 1977; Chalot *et al.*, 1988; Kropp y Langlois, 1990; Garbaye, 1991).

La capacidad del micosimbionte para estimular el crecimiento de la planta es el objetivo final más buscado, y por tanto, también es el criterio de selección más empleado. Desafortunadamente, determinar esta capacidad no es fácil. Como hemos visto, los efectos del hongo sobre la planta pueden ser diversos (absorción de minerales y agua, modificación del equilibrio hormonal, protección frente a patógenos,...) y aún no se dispone de ensayos sencillos de laboratorio que permitan predecir como se desarrollarán muchas de estas funciones en condiciones naturales. Por tanto, para la evaluación de la efectividad de un hongo hay que recurrir a la experimentación en campo, siempre con resultados a largo plazo.

Los conocimientos actuales permiten definir una serie de criterios a tener en cuenta durante el proceso de selección. En primer lugar es indispensable determinar el grado de compatibilidad con la especie forestal. Las cepas más agresivas e infectivas pueden detectarse por síntesis axénica (Molina, 1979a ; Molina y Palmer, 1982; Malajczuk *et al.*, 1990). Como hemos visto anteriormente, existe un grupo de hongos, al que podríamos denominar "pioneros", capaces de asociarse simbióticamente a plantas en estado juvenil y formar ectomicorrizas. Las técnicas de inoculación controlada se aplican durante la fase de vivero, y por tanto, estos hongos pioneros deben ser tomados especialmente en consideración.

El éxito de la aplicación de la investigación ectomicorrícica en reforestación dependerá, en gran medida, de la disponibilidad de un rango de hongos seleccionados capaces de mejorar la productividad forestal en distintas condiciones ambientales. No obstante, la utilización de estos hongos será imposible si no se dispone de métodos prácticos y eficaces para la producción y aplicación de inóculo.

En la práctica, la inoculación se realizará mediante la incorporación de un material, natural o preparado, al substrato de crecimiento del vivero. Este material, llamado inóculo, contendrá una forma infectiva del hongo ectomicorrícico que deseamos introducir. La micorrización controlada tendrá

lugar en un momento inicial del proceso de reforestación y proporcionará, utilizando la terminología empleada por Garbaye (1991), plantas "biológicamente mejoradas" mediante la optimización de su estado simbiótico.

Para poder producir cantidades suficientes de inóculo y ser utilizada a escala práctica, una cepa ectomicorrícica ha de crecer fácilmente en cultivo puro, sin necesidad de medios complejos, y sobrevivir sin dificultad a las manipulaciones necesarias para la producción y aplicación del inóculo (Marx y Kenney, 1982; Le Tacon *et al.*, 1985; Hung y Mollna, 1986a).

Con frecuencia, los inóculos de hongos ectomicorrícicos están compuestos por una biomasa fúngica y un material portador. El inóculo será tanto más eficaz en cuanto se consiga su producción en condiciones axénicas y se encuentre en un estado fisiológico adecuado para la iniciación de la micorrización. El material portador debe contener una cantidad suficiente y homogénea de biomasa fúngica y protegerla frente a las condiciones adversas que puedan producirse durante la producción y manipulación del inóculo. El método de obtención de inóculo ha de permitir su producción a gran escala con costos reducidos y su aplicación efectiva en volúmenes pequeños. Actualmente, muchos de los tipos de inóculo existentes solo satisfacen estos requisitos de una forma parcial.

Uno de los métodos más utilizados para la producción y aplicación de inóculos ectomicorrícicos consiste en el crecimiento micellar del hongo en un substrato sólido suplementado con solución nutritiva que posteriormente se incorpora al substrato o suelo del vivero (Marx y Kenney, 1982; Harvey, 1991). Inicialmente, el material portador solía estar constituido por semillas de cereales, o mezclas de las anteriores con turba o vermiculita. Se consiguieron buenos resultados con distintas especies ectomicorrícicas, plantas hospedadoras y condiciones ambientales (Moser, 1958, 1963; Theodorou, 1967; Takacs, 1961a, b, 1967; Theodorou y Bowen, 1970; Gölb, 1975). No obstante, la utilización de semillas de cereales presentaba problemas de contaminación con microorganismos saprófitos y se demostró que la producción de inóculo en un substrato de turba y vermiculita (Hacskeylo y Vozzo, 1967), suplementado con medio de cultivo líquido Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx y Bryan, 1975), ofrecía mejores resultados (Marx, 1980). Esta técnica de producción de inóculo ha sido adoptada universalmente y se ha utilizado con éxito para la inoculación de distintas

especies forestales en todo el mundo (Marx, 1980; Mexal, 1980; Marx y Kenney, 1982; Cordell *et al.*, 1987a; Le Tacon *et al.*, 1988; Kropp y Langlois, 1990; Marx *et al.*, 1991). Sin embargo, presenta algunos problemas como: la baja homogeneidad del cultivo y la necesidad de manejar grandes volúmenes de substrato en condiciones asépticas. Además, hay que asegurar que no contenga niveles residuales de carbohidratos que podrían comprometer la efectividad de la inoculación (Marx, 1980; Marx y Rowan, 1981; Marx *et al.*, 1991). La producción de este tipo de inóculo a escala comercial ha sido abordada, con mayor o menor éxito, en países como Estados Unidos y Francia y se ha aplicado en la producción de plantas micorrizadas en viveros, en contenedor (Marx *et al.*, 1982; Hung y Molina, 1986b; Hung y Trappe, 1987) y a raíz desnuda (Marx *et al.*, 1984a), con las especies ectomicorrícicas *Pisolithus tinctorius* y *Laccaria bicolor*.

Algunas técnicas desarrolladas en otros campos de la microbiología se han adaptado a la producción de inóculo ectomicorrícico. La inclusión del micelio fúngico en geles de polímeros inertes, como el alginato sódico, ha resultado ser un método eficaz (Le Tacon *et al.*, 1983, 1985; Mauperin *et al.*, 1987; Kuek *et al.*, 1992), que en el caso de *L. bicolor* ha dado mejores resultados que el inóculo producido en turba-vermiculita (Mortier *et al.*, 1988). Esta técnica permite un mejor control de las condiciones de crecimiento del hongo, una mayor homogeneidad del inóculo, períodos más largos de conservación y una dosificación más eficaz durante su aplicación en vivero. No obstante, aunque se ha utilizado con éxito para especies de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria*, su extensión a otras especies fúngicas está aún en vías de solución.

Todas estas técnicas de producción de inóculo requieren que el hongo sea capaz de crecer en medio de cultivo. Sin embargo, todavía no se han desarrollado medios de cultivo específicos para todas las especies ectomicorrícicas. Algunos hongos, aun siendo capaces de crecer en el substrato utilizado para la producción de inóculo, ofrecen resultados poco repetitivos al ser aplicados en vivero, demostrando una escasa o nula efectividad (Molina, 1980). En estos casos, la micorrización controlada requiere la utilización de otros tipos de inóculo.

Algunas especies, gracias a la abundancia de esporocarpos y a la gran cantidad de esporas que contienen, pueden ser utilizadas como inóculo en forma de esporas (Marx, 1976; Castellano y Trappe, 1985).

La inoculación con esporas no precisa de una fase de crecimiento en cultivo puro y su aplicación en vivero resulta sencilla. Sin embargo, debido a la inherente variabilidad genética entre las esporas, no es posible introducir una cepa específicamente seleccionada. Además, aunque se han desarrollado métodos para obtener grandes cantidades de basidiosporas a partir de esporocarpos de hongos Gasteromicetos (Theodorou, 1971; Theodorou y Bowen, 1973; Marx y Bryan, 1975; Marx *et al.*, 1976), Agaricales y Afilloforales (Marx y Ross, 1970; Lamb y Richards, 1974a ; Richards, 1975; Stack *et al.*, 1975), la obtención de inóculo está limitada por la disponibilidad de esporocarpos. La inoculación con esporas ha sido utilizada con distintas especies ectomicorrícicas para la micorrización de plantas producidas en contenedor o a raíz desnuda. *P. tinctorius*, una especie de amplia distribución geográfica (Marx, 1977) y de la que es fácil obtener un gran número de esporas (Marx y Bryan, 1975; Marx, 1976), ha sido utilizado con mayor o menor éxito usando distintas técnicas de aplicación: riego con suspensiones de esporas en agua, espolvoreando las esporas directamente sobre el sustrato, o mezclándolas con algún material portador utilizado para la inoculación del sustrato o la encapsulación de las semillas (Marx y Barnett, 1974; Marx, 1976; Marx *et al.*, 1976, 1978, 1979, 1984b; Ruehle y Marx, 1977; Ruehle, 1980; Azevedo, 1982; Marx y Kenney, 1982; Alvarez y Trappe, 1983; Marx y Bell, 1985). La inoculación con esporas ha sido empleada también con otras especies de hongos ectomicorrícicos: *Rhizopogon colossus* (Castellano y Trappe, 1985; Castellano *et al.*, 1985), *R. luteolus* (Theodorou, 1971; Theodorou y Bowen, 1970, 1973; Lamb y Richards, 1974a, b; Donald, 1975; Azevedo, 1982; Ivory y Munga, 1983; Chu-Chou y Grace, 1985), *R. nigrescens* (Ivory y Munga, 1983), *R. roseolus* (Lamb y Richards, 1974a, b), *R. rubescens* (Chu-Chou y Grace, 1985), *R. vinicolor* (Parke *et al.*, 1983a; Castellano y Trappe, 1985; Castellano *et al.*, 1985), *Scleroderma citrinum* (Azevedo, 1982), *S. texense* (Ivory y Munga, 1983), *Suillus granulatus* (Lamb y Richards, 1974a, b) y *Thelephora terrestris* (Marx y Ross, 1970). La aplicación de estos inóculos se realizó, generalmente, por riego con una suspensión acuosa o mediante semillas encapsuladas con esporas.

La importancia de las micorrizas en la práctica forestal se determinó hace ya mucho tiempo. Por un lado, se demostró que los graves problemas de crecimiento de los plantones de algunos viveros estaban asociados a su errática y escasa micorrización, causada por la baja densidad de propágulos ectomicorrícicos presentes en el suelo (Mitchel *et al.*, 1937; Trappe y Strand, 1969). Por otro lado, los intentos de aforestación y reforestación de zonas desarboladas, carentes de un nivel suficiente de inóculo ectomicorrícico, fallaron sistemáticamente hasta que no se introdujeron los simbioses ectomicorrícicos adecuados durante la fase de producción en vivero (Briscoe, 1959; Mikola, 1970; Vozzo y HacsKaylo, 1971; Marx, 1980).

El objetivo principal de la micorrización en vivero es aumentar la calidad fisiológica de las plantas y facilitar el establecimiento de masas forestales, reduciendo la mortalidad posterior al trasplante y acelerando el crecimiento inicial de los árboles.

Después del trasplante a campo, la planta se enfrenta a un cambio de las características fisicoquímicas del medio y a la presencia de una nueva microflora rizosférica simbiótica o patógena. Durante el proceso de regeneración de las raíces, la demanda de agua por parte de la planta puede exceder a la capacidad de absorción del sistema radical. Todos estos factores pueden producir una elevada mortalidad. La simbiosis ectomicorrícica aumenta la resistencia del árbol a las enfermedades radicales y le confiere una mejor explotación de los recursos del suelo. Por lo tanto, el estado micorrícico de la planta influirá en la repercusión de muchos de los anteriores factores, disminuyendo la mortalidad y el impacto que la reposición de estas plantas tendría sobre el costo total del establecimiento de la plantación.

Las funciones de movilización y absorción de elementos minerales aportadas por los hongos ectomicorrícicos pueden acelerar el crecimiento inicial de las plantas, reduciendo las operaciones de control de la vegetación competidora. Esta vegetación está constituida generalmente por plantas endomicorrícicas (gramíneas, helechos, retamas, zarzas, etc.) y el simbionte ectomicorrícico de la planta forestal introducida beneficiará selectivamente a esta última. Otra forma de acelerar el crecimiento sería la utilización de fertilizantes minerales, pero el abonado produciría un aumento paralelo de la vegetación competidora.

La micorrización controlada en todo tipo de viveros y su efecto en los procesos de reforestación en distintos países y condiciones ecológicas, han sido ampliamente estudiados y revisados (Bowen, 1965; Mikola, 1973; Trappe, 1977; Mexal, 1980; Molina y Trappe, 1984; Cordell *et al.*, 1987*b*; Perry *et al.*, 1987; Danielson, 1988; Le Tacon *et al.*, 1988; Marx y Cordell, 1988; Castellano y Molina, 1989; Marx y Ruehle, 1989; Kropp y Langlois, 1990), y actualmente no existe ninguna duda de que los hongos ectomicorrícicos son un componente esencial en los ecosistemas forestales (Vogt *et al.*, 1991).

En determinadas condiciones puede no ser imprescindible la reforestación con planta micorrizada, ya que en algunos suelos existe, de forma natural, una gran población de hongos simblotes (Kropp, 1982*b*). No obstante, los estudios ecológicos realizados con los hongos ectomicorrícicos indican que su número disminuye poco tiempo después de la tala de los árboles o la aplicación de fuego controlado (Harvey *et al.*, 1980; Persson, 1982; Parke *et al.*, 1984; Perry *et al.*, 1987).

La reforestación con planta micorrizada será mucho más necesaria si las poblaciones de hongos ectomicorrícicos del suelo son insuficientes para permitir una rápida colonización de los plantones trasplantados (Kendrick, 1988). Así, la micorrización controlada ha facilitado la revegetación en condiciones difíciles, como pueden ser la recuperación de suelos degradados o erosionados y escombreras de minas (Schramm, 1966; Marx, 1975, 1980; Marx y Artman, 1979; Grossnickle y Reid, 1982; Cordell *et al.*, 1987*c*), y la introducción de especies exóticas en distintas partes del mundo (Theodorou y Bowen, 1970; Momoh y Gbadegesin, 1980; Ofosu-Asiedu, 1980; Marx *et al.*, 1985; Delwaille *et al.*, 1987; Garbaye *et al.*, 1988). No obstante, la utilización de plantas micorrizadas en vivero ha mejorado también la repoblación en suelos forestales. La inoculación con *P. tinctorius* ha aumentado el crecimiento de especies como: *Pinus echinata* (Ruehle *et al.*, 1981*b*), *P. eliotii* (Marx *et al.*, 1977*a*), *P. taeda* (Marx *et al.*, 1977*a*; Berry y Marx, 1978; Marx *et al.*, 1988), *P. virginiana* (Marx *et al.*, 1977*a*) y *Quercus velutina* (Dixon *et al.*, 1981*b*) en distintas zonas de Estados Unidos. En Francia, se han obtenido buenos resultados en las repoblaciones realizadas con *Pseudotsuga menziesii* micorrizado con: *Hebeloma cylindrosporum*, *Laccaria bicolor* y *L. laccata* (Le Tacon *et al.*, 1988; Villeneuve *et al.*, 1991) y *Q. robur* micorrizado con: *H. crustuliniforme* y *Paxillus involutus* (Garbaye, 1990).

La asociación ectomicorrícica puede no tener como objetivo el beneficio del árbol, sino la fructificación del hongo con el fin de producir setas comestibles como: *Lactarius deliciosus*, *Suillus bovinus*, *S. granulatus* o *Tuber melanosporum* (Delmas, 1978; Olivier y Delmas, 1987; Verlhac, 1990). Algunos hongos ectomicorrícicos presentan una cierta capacidad saprofitica cuando disponen de compuestos de carbono simples, como los que encuentran en la rizosfera o los medios de cultivo en el laboratorio. No obstante, se pueden considerar simbiotes obligados en la medida que necesitan la asociación al hospedador para completar su ciclo y fructificar (Lalho, 1970). Por tanto, conseguir la asociación simbiótica es indispensable para la obtención de carpóforos.

En algunos casos, el efecto del hongo sobre el crecimiento de la planta en el vivero ha permitido reducir considerablemente el tiempo necesario para producir plantas con un desarrollo suficiente para ser trasplantadas a campo (Le Tacon y Bouchard, 1986). No obstante, los hongos más efectivos en vivero no son necesariamente los más efectivos en plantación (Stenström *et al.*, 1985). Las micorrizas formadas por la especie seleccionada han de soportar los procesos inherentes al establecimiento de una plantación forestal, como son: el desarraigado de la planta del vivero, el almacenaje, el transporte y el trasplante (Marx, 1979; Alvarez y Linderman, 1983; Al Abras *et al.*, 1991). El hongo inoculado no podrá mantenerse en el sistema radical de la planta si no es capaz de resistir, tanto en vivero como en plantación, la competencia ejercida por la microflora del suelo y la rizosfera (Garbaye, 1983; McAfee y Fortin, 1986). Perdiéndose su potencial efecto beneficioso sobre el crecimiento de la planta.

Actualmente, se dispone de suficiente información a nivel mundial del efecto de la inoculación en vivero sobre el establecimiento y desarrollo de distintas plantaciones forestales (Castellano, 1990; Garbaye, 1991). Estos datos permiten establecer que cuando los plantones presentan un buen estado micorrícico y el hongo introducido se mantiene después del trasplante a campo, aumenta la probabilidad de que la inoculación ectomicorrícica incremente significativamente la supervivencia y el crecimiento de la plantación, especialmente en zonas de condiciones extremas y cuando se tratan de introducir especies exóticas (Trofymov, 1990).

La puesta en práctica de la inoculación ectomicorrícica en vivero implicará, inevitablemente, una serie de consideraciones económicas. Extrapolando la experiencia existente en Francia (Garbaye, 1991) y Estados Unidos (Cordell *et al.*, 1987a), se puede calcular que el costo de la inoculación, incluidas la desinfección del suelo del vivero y la aplicación del Inóculo, puede variar entre las 100 y 200 Ptas por hectárea plantada, si el Inóculo se aplica en forma de esporas, y entre 3000 y 6000 Ptas si se utiliza Inóculo micellar. No obstante, el análisis económico debe hacerse desde el punto de vista del éxito de la plantación, y la inoculación ectomicorrícica representa solo un pequeño porcentaje de los costos asociados a la preparación del terreno, establecimiento de las plantas y mantenimiento durante los primeros años de plantación. Si se consiguiera un incremento de un 2.5 % en la supervivencia de las plantas, la tecnología ectomicorrícica se autofinanciaría (Kropp y Langlois, 1990). Considerando el número de plantas utilizadas anualmente en reforestación y los miles de hectáreas que aún quedan por reforestar, la inoculación ectomicorrícica no solo es rentable, sino que adquiere una importancia creciente.

Hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* en el
norte de España

Introducción

Pinus pinaster Ait. es una especie forestal de importancia económica en países como España, Francia, Italia y Portugal y ha sido introducida con éxito en varias zonas del mundo (Argentina, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica,...). No obstante, el conocimiento de los hongos potencialmente ectomicorrícicos asociados a *P. pinaster* es bastante reducido y son muy pocas las especies fúngicas con las que dicha capacidad simbiótica haya sido demostrada experimentalmente (Tabla 2.1).

Ferreira dos Santos (1941) consiguió la micorrización de *P. pinaster* con *Boletus fragrans*, tanto en condiciones de síntesis en cultivo puro, como utilizando un inóculo micellar del hongo, producido en un medio compuesto por avena, paja y una solución de sales minerales, que se incorporaba al sustrato de los contenedores en los que se hacía crecer la planta.

Trabajos posteriores (Takacs, 1961a), citan la obtención de ectomicorrizas en *P. pinaster* utilizando cultivos puros de *Scleroderma citrinum* (*S. vulgare* Fr.) y *Suillus granulatus* (*Boletus granulatus* Fr.); así como la inoculación, en condiciones de vivero, de *P. pinaster* y otras especies del género *Pinus* utilizando inóculos puros de *Amanita phalloides*, *S. citrinum* (*S. vulgare*), *S. granulatus* (*B. granulatus*) y *Russula* sp., obtenidos por crecimiento micellar en un sustrato compuesto por granos de cebada (Takacs, 1961b). Las plantas micorrizadas presentaban un mejor desarrollo vegetativo, pero las micorrizas formadas y el efecto sobre el crecimiento de la planta no pueden atribuirse claramente al inóculo introducido, ya que en ninguno de los experimentos se desinfectó el suelo del vivero, y por tanto, la actividad de la micoflora ectomicorrícica natural del suelo podría afectar la interpretación de los resultados.

Tabla 2.1

Hongos ectomicorrícicos citados en asociación con *Pinus pinaster*. *

- Amanita citrina* (Schff.) Gray - Fernández de Ana et al., 1989.
Amanita gemmata (Fr.) Gill. - Fernández de Ana et al., 1989.
Amanita muscaria (L. ex Fr.) Pers. ex Hook. - Azevedo (En: Marx, 1980); Fernández de Ana et al., 1989.
Amanita phalloides (Vaill. ex Fr.) Secr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Amanita rubescens (Pers. ex Fr.) Gray - Fernández de Ana et al., 1989.
Amanita spissa (Fr.) Kummer - Fernández de Ana et al., 1989.
Boletus edulis Bull. ex Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Boletus erythropus (Fr.) Krombh. non Pers. - Fernández de Ana et al., 1989.
Boletus fragrans Vitt. - Ferreira dos Santos, 1941; Trappe, 1962.
Cantharellus cibarius Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Cantharellus tubaeformis Bull. ex Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Cenococcum geophilum Fr. - Trappe, 1962, 1964.
Chroogomphus rutilus (Schaeff. ex Fr.) Miller - Guinberteau et al., 1990.
Clavulina rugosa (Fr.) Schrost. - Guinberteau et al., 1990.
Gomphidius viscidus L. ex Fr. - Guinberteau et al., 1990.
Hebeloma crustuliniforme (Bull. ex Fr.) Qué1. - Guinberteau et al., 1990.
Hebeloma cylindrosporum Romagn. - Delmas et al., 1978; Mousain et al., 1979; Rancillac, 1982; David et al., 1983; Deboud y Gay, 1987; Plassard et al., 1988; Scheromm et al., 1990.
Hebeloma sacchariolens Qué1. - Guinberteau et al., 1990.
Hebeloma sinapizans (Paul. ex Fr.) Gill. - Branzanti y Zambonelli, 1987.
Hydnum repandum L. ex Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Hygrophorus hypothejus (Fr. ex Fr.) Fr. - Guinberteau et al., 1990.
Inocybe decipiensoides Peck. - Guinberteau et al., 1990.
Laccaria amethystina (Bolt. ex Hooker) Murr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Laccaria laccata (Scop. ex Fr.) Berk. & Br. - Branzanti y Zambonelli, 1987; Fernández de Ana et al., 1989; Guinberteau et al., 1990.
Lactarius deliciosus (L. ex Fr.) S.F. Gray - Barsali, 1922; Trappe, 1962; Mousain et al., 1976; Poitou et al., 1982; Fernández de Ana et al., 1989.
Lactarius hepaticus Plowr. ex Boud. (ss. Neuh.) - Guinberteau et al., 1990.
Lactarius piperatus (L. ex Fr.) Gray - Fernández de Ana et al., 1989.
Lactarius vellereus (Fr.) Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Lactarius volemus (Fr.) Fr. - Barsali, 1922; Trappe, 1962.
Paxillus involutus (Batsch. ex Fr.) Fr. - Branzanti y Zambonelli, 1987.
Pisolithus tinctorius (Pers.) Cok. & Couch - Marx y Bryan, 1970; Marx, 1977; Mousain et al., 1977, 1979; Delmas et al., 1978; Rühle et al., 1981a; Azevedo, 1982; Rancillac, 1982; David et al., 1983; Plassard et al., 1983; Dexheimer et al., 1986; Doumas et al., 1986.
Rhizopogon luteolus Fr. & Nordh. - Azevedo, 1982; Guinberteau et al., 1990.
Russula amoenolens Romagn. - Fernández de Ana et al., 1989.
Russula cessans Pearson - Guinberteau et al., 1990.
Russula cyanoxantha Schff. ex Fr. - Azevedo (En: Marx, 1980); Fernández de Ana et al., 1989.
Russula emetica (Schaeff. ex Fr.) Pers. ex Fr. - Barsali, 1922; Trappe, 1962.
Russula foetens Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Russula nigricans (Bull.) Fr. - Fernández de Ana et al., 1989.
Russula palumbina Qué1. (*R. grisea* Romagn.) - Barsali, 1922; Trappe, 1962.
Russula queletii Fr. in Qué1. - Fernández de Ana et al., 1989.
Russula sardonia Fr. ex Rom. - Fernández de Ana et al., 1989; Guinberteau et al., 1990.
Russula torulosa Bres. - Guinberteau et al., 1990.
Russula turci Bres. ss. Maire - Fernández de Ana et al., 1989.
Scleroderma citrinum Pers. (*S. aurantium* (Vaill.) Pers.; *S. vulgare* Fr.) - Takacs, 1961a; Trappe, 1962; Azevedo, 1982; Fernández de Ana et al., 1989.
Suillus bovinus (L. ex Fr.) O. Kuntze - Barsali, 1922; Rayner y Levisohn, 1941; Trappe, 1962; Plassard et al., 1988; Fernández de Ana et al., 1989; Guinberteau et al., 1990.

.../...

Tabla 2.1 (Cont.)

<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) O. Kuntze (<i>Boletus granulatus</i> Fr. ex L.) - Barsali, 1922; Costantini, 1923; Singer, 1945; Heim, 1957; Takacs, 1961a; Trappe, 1962; Azevedo (En: Marx, 1980); Poitou et al., 1982; Branzanti y Zambonelli, 1987.
<i>Suillus luteus</i> (L. ex Fr.) S.F. Gray (<i>Boletus luteus</i> Fr. ex L.) - Poitou et al., 1982.
<i>Thelephora terrestris</i> (Ehrh.) Fr. - Marx y Bryan, 1970; Ruehle et al., 1981a; Guinberteau et al., 1990.
<i>Tricholoma colossus</i> (Fr.) Qué1. - Fernández de Ana et al., 1989.
<i>Tricholoma flavovirens</i> (Pers. ex Fr.) Lund. - Poitou et al., 1982; Fernandez de Ana et al. 1989.
<i>Tricholoma malluvium</i> (Batt. ex Fr.) Sacc. - Fernández de Ana et al., 1989.
<i>Tricholoma pessundatum</i> (Fr.) Qué1. - Guinberteau et al., 1990.
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Qué1. - Fernández de Ana et al., 1989.
<i>Tricholoma saponaceum</i> (Fr.) Kummer - Fernández de Ana et al., 1989.
<i>Tricholoma terreum</i> (Schff. ex Fr.) Kummer - Azevedo (En: Marx, 1980).
<i>Tuber borchii</i> Vitt. - Ceruti, 1985.
<i>Xerocomus badius</i> (Fr. ex Fr.) Gilbert - Fernández de Ana et al., 1989.

* Las citas en negrilla hacen referencia a la síntesis de ectomicorrizas entre ambas especies mediante la incorporación de inóculo fúngico, las restantes son posibles asociaciones resultado de observaciones de campo.

Durante la década de los 70 y principios de los 80, el estudio de los hongos ectomicorrícicos asociados a *P. pinaster*, y las posibilidades de utilización de distintas especies fúngicas para la inoculación de plantas producidas en vivero, recibió un importante impulso a raíz de los trabajos de Azevedo en Portugal (Marx, 1980; Azevedo, 1982). El tipo de inóculo empleado consistía en un triturado de esporocarpos, previamente deshidratados, pertenecientes a distintas especies fúngicas recolectadas en plantaciones forestales de *P. pinaster*. Se puede asumir que la fracción funcional de estos inóculos estaba constituida por las basidiosporas (Marx, 1980). Este inóculo se utilizaba para recubrir semillas desinfectadas que se sembraban en contenedores con una mezcla esterilizada de: suelo, arena y turba. Con esta técnica de inoculación, Azevedo demostró la capacidad ectomicorrícica para *P. pinaster* de: *Amanita muscaria*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon luteolus*, *Russula cyanoxantha*, *S. citrinum* (*S. aurantium* Vall. ex Pers.), *Suillus granulatus* y *Tricholoma terreum*.

P. tinctorius y *Thelephora terrestris* (Ruehle *et al.*, 1981a), así como *Hebeloma sinapizans*, *Laccaria laccata*¹, *Paxillus involutus* y *S. granulatus* (Branzanti y Zambonelli, 1987), también fueron utilizados con éxito para la inoculación de *P. pinaster* en condiciones de contenedor y en "microplots" en vivero. Los hongos se aplicaban en forma de inóculo miceliar, producido en un sustrato compuesto por turba, vermiculita y medio nutritivo (Marx y Bryan, 1975), que se mezclaba con el sustrato desinfectado del vivero.

P. tinctorius y *Hebeloma cylindrosporum*, capaz de fructificar *in vitro* en asociación con *P. pinaster* (Debaud y Gay, 1987), incrementan el desarrollo vegetativo de la planta al ser inoculadas en distintos tipos de suelo y en condiciones controladas (Mousain *et al.*, 1977, 1979). Se han desarrollado métodos para evaluar la masa miceliar y la micorrización de plantas de *P. pinaster*, inoculadas con ambas especies fúngicas, tanto en condiciones axénicas como en vivero (Plassard *et al.*, 1983, 1988).

Así mismo, la inoculación con *H. cylindrosporum* y *P. tinctorius* estimula el desarrollo radical de las plántulas de *P. pinaster* obtenidas por propagación vegetativa *in vitro*, influyendo en su capacidad para superar la fase de aclimatación a las condiciones de vivero (Rancillac, 1982; David *et al.*, 1983).

Se han hecho estudios ultraestructurales de la localización de las actividades fosfatásicas ácidas en las ectomicorrizas formadas entre *P. tinctorius* y *P. pinaster* (Dexheimer *et al.*, 1986). Se ha demostrado que, en condiciones limitantes de fósforo, las fosfatasa sintetizadas por *P. tinctorius* son capaces de hidrolizar los compuestos fosforilados del suelo con una eficiencia mayor que los enzimas de *P. pinaster*, pudiendo aumentar la disponibilidad de fósforo para la planta (Doumas, *et al.*, 1986; Berjaud *et al.*, 1987).

El papel de *H. cylindrosporum* y *P. tinctorius* en la captación de nitrógeno en forma de iones amonio y nitrato, ha sido recientemente estudiado (Plassard *et al.*, 1990), y se ha determinado que la micorrización

¹ La cepa S-238, utilizada en los experimentos citados, fue posteriormente reclasificada como *Laccaria bicolor* (Armstrong *et al.*, 1989)

de *P. pinaster* con *H. cylindrosporum* aumenta el transporte de nitrógeno reducido a través del floema de la planta (Scheromm *et al.*, 1990).

Pinus pinaster ha sido utilizado como planta hospedadora para la micorrización con distintas especies fúngicas comestibles, como: *Lactarius deliciosus*, *Suillus granulatus*, *S. luteus* y *Tricholoma flavovirens* (Poitou *et al.*, 1982, 1983). El establecimiento de plantaciones experimentales de *P. pinaster*, micorrizados con *L. deliciosus* y *S. granulatus*, ha demostrado la posibilidad de obtener fructificaciones de ambas especies fúngicas a partir del segundo o tercer año de plantación (Guinberteau *et al.*, 1990), ofreciendo un interesante valor añadido a las plantaciones forestales realizadas con esta especie vegetal.

En España, a pesar de que *P. pinaster* es una de las especies forestales más importantes, con una superficie total de 1.5 millones de hectáreas, y que las repoblaciones efectuadas con esta especie representan el 25 % de la superficie total repoblada hasta 1987, se ha dedicado un escaso esfuerzo de investigación al estudio de los hongos ectomicorrícicos asociados a esta especie vegetal en las plantaciones forestales de nuestro ámbito territorial.

El conocimiento de estas especies fúngicas es indispensable para poder llevar a cabo un proceso de selección de hongos ectomicorrícicos, adaptados a nuestras condiciones ecológicas, y que puedan ser utilizados para la micorrización controlada de *P. pinaster* en vivero con la finalidad de mejorar la calidad de la planta destinada a reforestación.

El objetivo principal del trabajo que se presenta en este apartado es aumentar el conocimiento de los hongos ectomicorrícicos asociados a *P. pinaster* en las zonas destinadas a la producción forestal en el norte de España, y determinar, mediante síntesis en cultivo puro, la capacidad de formación de ectomicorrizas entre *P. pinaster* y las distintas cepas fúngicas aisladas.

La demostración experimental de la capacidad ectomicorrícica de los hongos aislados es el paso inicial e indispensable para establecer el rango de cepas fúngicas con las que se trabajará durante el proceso de selección. No obstante, no se ha contemplado como un test definitivo, sino tan solo eliminativo, con el que se descartarán todas aquellas cepas fúngicas con una escasa o nula capacidad ectomicorrícica con *P. pinaster*.

Materiales y Métodos

Hongos ectomicorrícicos. Aislamiento y mantenimiento en cultivo puro.

Los cultivos puros de los hongos utilizados se aislaron a partir de esporocarpos recogidos en plantaciones forestales localizadas en el norte de España (Tabla 2.2). Las recolecciones en campo se realizaron de una forma sistemática y durante todas las épocas del año, pero con mayor intensidad en los meses de otoño. También se incluyeron algunos cultivos procedentes de colecciones de hongos ectomicorrícicos establecidas en otros centros de investigación (Tabla 2.3).

Los esporocarpos de las distintas especies de hongos epigeos e hipogeos, recogidos preferentemente jóvenes y en buenas condiciones, se guardaban en bolsas de papel y se anotaban los datos referentes a las características de la zona de recolección, así como las posibles especies vegetales hospedadoras. Una vez en el laboratorio, se procedía a la determinación de las características macroscópicas y microscópicas de los especímenes recogidos y a su clasificación provisional (Moser, 1980; Miller, 1982, 1983; Singer, 1986). El aislamiento en cultivo puro se realizó a partir de los tejidos internos del esporocarpo, utilizando aquellas zonas que no evidenciaban ningún contacto con posibles fuentes de contaminación externa (Molina y Palmer, 1982). Asépticamente, se transferían fragmentos del micelio del esporocarpo (2-5 mm³ de tamaño) a placas Petri, o tubos de ensayo, con medio de cultivo Mellin-Norkrans modificado (MMN)¹ (Marx, 1969) autoclavado a 120 °C durante 15 min. Generalmente, los tejidos del esporocarpo suelen estar diferenciados, por lo que se realizaban varios intentos de aislamiento a partir de distintas localizaciones dentro de un mismo esporocarpo. Los ejemplares, a partir de los que se habían realizado los aislamientos, se secaban a una temperatura de 40-50 °C durante 5-7 días en una estufa de desecación por aire forzado, y se conservaban como especímenes de herbario para posteriores comprobaciones y confirmaciones taxonómicas.

¹ Extracto de Malta (Difco) 3.0 g, d-Glucosa 10.0 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.25 g, KH₂PO₄ 0.50 g, MgSO₄-7H₂O 0.15 g, CaCl₂ 0.05 g, NaCl 0.025 g, Sequestrene 0.02 g, Tiamina (HCl) 100 µg, Bacto-Agar (Difco) 15.0 g, H₂O destilada 1 L ; pH = 5.5

El aislamiento de *Cenococcum geophilum* se realizó a partir de esclerocios separados del suelo por tamizado en fase acuosa (Trappe, 1969), utilizando un paso de poro de 0.35 mm. La fracción final se resuspendía en agua y los esclerocios se recogían manualmente bajo la lupa binocular. Se desinfectaban por sonicación en un baño de agua durante 10 min y se sumergían durante 10-20 min en una solución de peróxido de hidrógeno al 30 %. Se lavaban tres veces consecutivas en agua destilada estéril y se transferían a placas con medio de cultivo MMN.

Los tubos y placas sembrados se incubaban a 25 °C. La primera observación se realizaba transcurridos 4-5 días, para comprobar el crecimiento inicial y rechazar las contaminaciones causadas por bacterias, levaduras y hongos conidiógenos. Los cultivos se mantenían en incubación hasta 7-40 días según la rapidez de crecimiento de cada una de las especies fúngicas. Se consideraban aislamientos positivos los casos en que: se observaba una clara uniformidad en las características del micelio que emergía de varios cultivos del mismo esporocarpo y no se detectaba la presencia de conidios (Hutchison, 1989).

Los cultivos puros, bien establecidos, se transferían a tubos de ensayo con medio MMN (3-4 tubos por aislamiento) y se incubaban a 25 °C durante 7-15 días. Una vez que los nuevos cultivos alcanzaban un desarrollo suficiente, se conservaban a 4 °C para constituir el banco de material fúngico sometido a evaluación y selección. Esta operación se repetía cada tres meses para mantener la viabilidad de la colección de cultivos.

Síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro.

Desinfección, estratificación y germinación de semillas.

Las semillas de *P. pinaster*, procedentes del noroeste de la Península Ibérica (Galicia y norte de Portugal) y conservadas a 4 °C, se limpiaban superficialmente en agua corriente en circulación durante 12 horas. Transcurrido este periodo, se eliminaban las semillas que permanecían en flotación y se procedía a la desinfección superficial de las restantes mediante su inmersión en H₂O₂ al 30% durante 1 hora (Barnett, 1976). Una vez desinfectadas, se lavaban con una cantidad suficiente de agua destilada

Tabla 2.2

Aislamientos de hongos potencialmente ectomicorrícicos, obtenidos a partir de esporocarpos recogidos en plantaciones forestales del norte de España, y probados en síntesis en cultivo puro para determinar su capacidad de formación de ectomicorrizas con *Pinus pinaster*.

Especie fúngica	Nº de cultivo	Especie vegetal asociada	Año de recolección	Localidad	Altitud (m)	pH del suelo
<i>Amanita aspera</i> (Fr.) Hooker	A-48	<i>Quercus robur</i>	1986	Asturias	320	3.7
<i>Amanita citrina</i> (Schff.) S.F. Gray	A-145	<i>Picea</i> sp.	1990	Girona	1100	5.6
	A-157	<i>Quercus ilex</i>	1990	Girona	200	6.2
<i>Amanita muscaria</i> (L. ex Fr.) Pers. ex Hooker	A-17	<i>Castanea sativa</i>	1985	Pontevedra	40	5.2
	A-124	<i>Abies grandis</i>	1989	Girona	1100	5.5
	A-151	<i>Abies</i> sp.	1990	Girona	1100	5.5
<i>Amanita pantherina</i> (D.C. ex Fr.) Kummer	A-67	<i>Quercus robur</i>	1988	Asturias	40	5.2
	A-149	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1990	Girona	1100	5.6
<i>Amanita rubescens</i> (Pers. ex Fr.) S.F. Gray	A-73	<i>Castanea sativa</i>	1988	Asturias	340	-
	A-148	<i>Fagus sylvatica, Quercus</i> sp.	1990	Girona	1100	5.6
<i>Amanita spissa</i> (Fr.) Kummer	A-150	<i>Abies</i> sp.	1990	Girona	1100	5.6
<i>Boletus edulis</i> Bull. ex Fr.	A-79	<i>Castanea sativa</i>	1986	Asturias	340	-
	A-39	<i>Pinus sylvestris</i>	1988	Asturias	530	3.7
	A-45	<i>Fagus sylvatica</i>	1988	Asturias	1000	4.1
	A-154	<i>Quercus ilex</i>	1990	Girona	1000	5.6
<i>Boletus erythropus</i> (Fr. ex Fr.) Pers.	A-47	<i>Castanea sativa</i>	1988	Asturias	320	3.7
<i>Boletus pulverulentus</i> Opat.	A-146	<i>Castanea sativa</i>	1990	Girona	1000	5.6
	A-144	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1990	Girona	1200	-
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	A-58	<i>Quercus robur</i>	1988	Asturias	300	3.9
<i>Clitopilus prunulus</i> (Scop. ex Fr.) Kummer	A-63	<i>Q. petraea, C. avellana</i>	1988	Asturias	730	4.0
<i>Collybia dryophyla</i> (Bull. ex Fr.) Kummer	A-65	<i>Corylus avellana</i>	1988	Asturias	730	4.0
<i>Collybia maculata</i> (Alb. & Schff. ex Fr.) Kummer	A-49	<i>Pinus sylvestris</i>	1988	Asturias	600	5.1
<i>Collybia succinea</i> (Fr.) Quéf.	A-88	<i>Castanea sativa</i>	1988	Pontevedra	-	-
<i>Cortinarius caeruleus</i> Schff. ex Secr.	A-125	<i>Abies grandis</i>	1989	Girona	1100	5.5
<i>Cortinarius glaucopus</i> (Schff. ex Fr.) Fr.	A-14	<i>Castanea sativa</i>	1985	Pontevedra	-	-
<i>Cortinarius purpurascens</i> Fr. ex Fr.	A-136	<i>Pinus pinaster</i>	?	?	?	?
<i>Elaphomyces granulatus</i> Fr.	A-126	<i>Picea abies</i>	1989	Barcelona	20	7.5
<i>Hebeloma sinapizans</i> (Paul. ex Fr.) Gill.	A-11	<i>Pinus radiata</i>	1988	Asturias	240	4.2
<i>Hysterangium clathroides</i> Vitt.	A-44	<i>Fagus sylvatica</i>	1988	Asturias	550	4.1

Tabla 2.2 (Cont.)

Especie fúngica	Nº de cultivo	Especie vegetal asociada	Año de recolección	Localidad	Altitud (m)	pH del suelo
<i>Laccaria amethystina</i> (Bolt. ex Hooker) Murr.	A-52	<i>Quercus petraea</i>	1986	Asturias	740	4.0
<i>Laccaria farinacea</i> (Huds. ex Gray) Sing.	A-32	<i>Pinus radiata</i>	1986	Asturias	500	3.7
<i>Laccaria laccata</i> (Scop. ex Fr.) Berk. & Br.	A-54	<i>Fagus sylvatica</i>	1986	Asturias	780	-
	A-127	<i>Quercus ilex</i>	1989	Girona	1000	4.9
<i>Laccaria proxima</i> (Boud.) Orton ss. Favre, Sing.	A-40	<i>Fagus sylvatica</i>	1986	Asturias	610	3.4
<i>Lactarius acerrimus</i> Britz	A-46	<i>Quercus robur</i>	1986	Asturias	320	3.7
<i>Lactarius chrysorrhoeus</i> Fr.	A-156	<i>Quercus ilex</i>	1990	Girona	200	6.2
<i>Lactarius delicosus</i> L. ex Fr.	A-81	<i>Pinus pinaster</i>	1987	Asturias	80	-
	A-120	<i>Pinus pinaster</i>	1988	Girona	200	5.6
	A-159	<i>Pinus pinaster</i>	1990	Girona	200	5.6
<i>Lactarius rufus</i> (Scop. ex Fr.) Fr.	A-34	<i>Pinus sylvestris</i>	1986	Asturias	610	5.8
<i>Lepista nuda</i> (Bull. ex Fr.) Cke.	A-76	<i>Pinus pinaster</i>	1986	Pontevedra	-	-
<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers. ex Pers.	A-72	<i>Pinus pinaster</i>	1985	Asturias	80	4.6
	A-77	<i>Pinus pinaster</i>	1986	Pontevedra	-	-
<i>Lycoperdon pyriforme</i> Pers. ex Schff.	A-83	<i>Fagus sylvatica</i>	1986	Cantabria	550	-
<i>Lyophyllum decastes</i> (Fr.) Sing.	A-71	<i>Pinus radiata</i>	1986	Asturias	240	4.2
<i>Melanogaster ambigua</i> (Vitt.) Tul. & Tul.	A-132	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1989	Girona	1100	5.6
<i>Paxillus involutus</i> (Batsch. ex Fr.) Fr.	A-41	<i>Pinus sylvestris</i>	1986	Asturias	600	5.0
	A-87	<i>Castanea sativa</i>	1986	Pontevedra	-	-
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker & Couch.	A-93	<i>Quercus suber</i>	1986	Girona	50	-
	A-141	<i>Quercus suber</i>	1990	Girona	200	6.2
<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr. & Nordh.	A-5	<i>Pinus pinaster</i>	1985	Pontevedra	-	-
	A-106	<i>Pinus pinaster</i>	1987	Pontevedra	-	4.7
<i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda ex Sturm) Fr.	A-7	<i>Pinus radiata</i>	1985	Asturias	350	-
	A-96	<i>Pinus sylvestris</i>	1987	Tarragona	1000	7.2
<i>Rhizopogon subareolatus</i> Smith	A-160	<i>Pinus pinaster</i>	1991	Girona	100	5.6
	A-104	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1987	Girona	1100	4.7
<i>Rhizopogon ventricisporus</i> Smith	A-116	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1987	Girona	1100	5.5
<i>Rhizopogon vulgaris</i> (Vitt.) M. Lange	A-97	<i>Pinus sylvestris</i>	1987	Tarragona	1000	7.2
	A-56	<i>Pinus radiata</i>	1986	Asturias	100	5.1
	A-98	<i>Pinus pinaster</i>	1987	Pontevedra	-	-
	A-101	<i>Pinus pinaster</i>	1987	Pontevedra	-	4.7
<i>Scleroderma cepa</i> Pers.	A-18	<i>Castanea sativa</i>	1985	Pontevedra	-	-
<i>Scleroderma citrinum</i> Pers.	A-37	<i>Castanea sativa</i>	1986	Asturias	-	-
<i>Scleroderma polyrhizum</i> Gmel. ex Pers.	A-61	<i>Pinus sylvestris</i>	1986	Asturias	610	5.0
	A-99	<i>Pinus pinaster</i>	1987	Pontevedra	-	-

.../...

Tabla 2.2 (Cont.)

Especie fúngica	Nº de cultivo	Especie vegetal asociada	Año de recolección	Localidad	Altitud (m)	pH del suelo
<i>Suillus bovinus</i> (L. ex Fr.) Kuntze	A-21	<i>Pinus radiata</i>	1985	Asturias	350	-
	A-22	<i>Pinus pinaster</i>	1985	Asturias	100	3.9
	A-75	<i>Castanea sativa</i>	1986	Pontevedra	-	-
<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) Kuntze	A-82	<i>Pinus pinaster</i>	1986	Asturias	80	-
	A-140	<i>Pinus sylvestris</i>	1990	Barcelona	1400	-
<i>Suillus luteus</i> (L. ex Fr.) S.F. Gray	A-33	<i>Pinus radiata</i>	1986	Asturias	100	-
	A-57	<i>Pinus radiata</i>	1986	Asturias	240	4.2
	A-155	<i>Pinus sylvestris</i>	1990	Barcelona	1400	-
<i>Suillus variegatus</i> (Swartz ex Fr.) Kuntze	A-142	<i>Pinus sylvestris</i>	1990	Barcelona	1400	-
<i>Tricholoma columbetta</i> (Fr.) Kummer	A-74	<i>Quercus robur</i>	1986	Asturias	300	-
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quéf.	A-92	<i>Pinus pinaster</i>	1986	Pontevedra	-	-
<i>Tricholoma saponaceum</i> (Fr. ex Fr.) Kummer	A-121	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1988	Girona	1100	5.5
<i>Tricholoma sulphureum</i> (Bull. ex Fr.) Kummer	A-80	<i>Quercus robur</i>	1986	Asturias	300	-
<i>Xerocomus chrysenteron</i> (Bull. ex St. Amans) Quéf.	A-119	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1988	Girona	1100	5.5
	A-147	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1990	Girona	1100	5.5

Tabla 2.3

Aislamientos de hongos ectomicorrizicos obtenidos de colecciones establecidas en otros centros de investigación y utilizados para determinar su capacidad simbiótica con *P. pinaster* mediante síntesis en cultivo puro.

Especie fúngica	Nº de cultivo	Especie vegetal asociada	Año de aislamiento	Centro de investigación de procedencia
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull. ex St. Amans) Qué1.	S-66	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K. ¹
<i>Hebeloma cylindrosporium</i> Romagn.	S-20	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.
<i>Hebeloma subseponaceum</i>	S-68	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.
<i>Laccaria bicolor</i> (R.Mre.) Orton	S-238	<i>Larix occidentalis</i>	-	For. Serv. Corvallis, Oregon, U.S.A. ²
<i>Laccaria proxima</i> ((Boud.) Orton ss. Favre, Sing.	S-64	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.
<i>Rhizopogon colossus</i> Smith	S-148	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1965	For. Serv. Corvallis, Oregon, U.S.A.
<i>Rhizopogon ellenae</i> Smith	8974	<i>Pinus ponderosa</i>	1986	For. Serv. Corvallis, Oregon, U.S.A.
<i>Rhizopogon hawkeri</i> Smith	S-274	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1976	For. Serv. Corvallis, Oregon, U.S.A.
<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr. & Nordh	G-823	<i>Pinus pinaster</i>	-	Centr. For. Lourizan, Galicia.
<i>Rhizopogon mutabilis</i> Smith	S-483	-	-	For. Serv. Corvallis, Oregon, U.S.A.
<i>Rhizopogon occidentalis</i> Zeller & Dodge	7544	<i>Pinus ponderosa</i>	1983	For. Serv. Corvallis, Oregon, U.S.A.
<i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda ex Sturm) Fr.	M-1	<i>Pinus halepensis</i>	1989	Univ. de Murcia.
	M-2	<i>Pinus pinaster</i>	1989	Univ. de Murcia.
<i>Rhizopogon vinicolor</i> Smith	S-47	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.
<i>Suillus collinitus</i> (Fr.) O. Kuntze	I-1	<i>Pinus nigra</i>	1989	Inst. Patol. Veg., Roma. Italia. ⁵
<i>Thelephora terrestris</i> (Ehrh.) Fr.	R-34	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.
	R-38	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.
	S-63	-	-	Univ. de Surrey, Inglaterra, U.K.

- Cultivos proporcionados por R. Jackson (Univ. de Surrey, Inglaterra. U.K.) ectomicorrizicos para *Picea sitchensis* y *Pseudotsuga menziesii*.
- Cultivo proporcionado por F. Le Tacon (INRA, Nancy. Francia.) y originalmente aislado por R. Molina (For. Serv. USDA, Oregon. USA.)
- Cultivo proporcionado por A. Fernandez (Centro Forestal de Lourizan, Galicia. España.) aislado a partir de un esporocarpo recolectado en Villarreal, Portugal.
- Cultivos aislados en el Dept. Patol. Veg. del IRTA a partir de esporocarpos recolectados por P. Torres (Depto. Biol. Veg. Univ. de Murcia) en Fuensanta (Murcia) y Rio Mundo (Albacete).
- Cultivo proporcionado por T. Annesy (Inst. Patol. Veg. Roma, Italia) aislado a partir de un esporocarpo recogido en un vivero forestal.

estéril (120 °C, 15 min) para eliminar el exceso de desinfectante y se sembraban asépticamente en viales con 3 ml de agar extracto de malta (MA)¹ al 2%. Las semillas sembradas en los viales se sometían a un proceso de estratificación a 4 °C durante 25 ó 30 días. Después de la estratificación, los viales se incubaban a 20 °C durante 7 días y se procedía a eliminar las semillas contaminadas por hongos o bacterias que habían escapado al proceso de desinfección. Las semillas no contaminadas se hacían germinar a temperatura ambiente y bajo un fotoperiodo de 12 horas con una intensidad lumínica de 135 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Preparación de los cultivos fúngicos.

Los distintos aislados fúngicos a evaluar (Tablas 2.2 y 2.3) se transferían, de los tubos de la colección de cultivos, a placas de medio MMN. Se sembraban tres placas para cada hongo y se incubaban a 25 °C durante 7, 15 ó 25 días. A partir de las colonias suficientemente desarrolladas, se transferían 5 discos de 5 mm de diámetro a tubos de ensayo con 13 ml de medio líquido MMN² estéril (120 °C, 15 min). Se sembraban 8 tubos para cada cepa fúngica y se incubaban a 25 °C durante 7 ó 15 días. Los cultivos se agitaban cada 3 días para fragmentar el micelio y obtener un crecimiento disperso y uniforme en todo el medio.

Síntesis de ectomicorrizas.

La capacidad ectomicorrícica de los distintos aislados fúngicos se determinaba siguiendo la técnica descrita por Molina (Molina, 1979a, 1981; Molina y Trappe, 1982a). Se preparaban cinco tubos de ensayo (300 mm x 38 mm de diam. -tubo de síntesis-) para cada hongo a ensayar. Cada uno de los tubos contenía 110 ml de vermiculita (3 mm de tamaño de partícula) y 10 ml de turba tamizada (1 mm de tamaño de partícula). La mezcla de substrato se

¹ Extracto de Malta (Difco) 20 g, Bacto-Agar (Difco) 10 g, Agua destilada 1 L.

² d-Glucosa 5.00 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.25 g, KH₂PO₄ 0.50 g, MgSO₄-7H₂O 0.15 g, CaCl₂ 0.05 g, NaCl 0.025 g, Sequestrone 0.02 g, Tiamina (HCl) 100 μg , H₂O destilada 1 L, pH = 5.5

humedecía con 70 ml de medio líquido MMN modificado¹ y se autoclavaba durante 30 min a 120 °C. En cada uno de los tubos se sembraba una semilla de *P. pinaster* germinada en condiciones estériles y con una radícula de 1-2 cm de longitud. Se seleccionaban cinco cultivos en medio líquido con un crecimiento comparable de cada uno de los hongos y la suspensión de micelio se transfería a un tubo de síntesis, estableciendo cinco repeticiones para cada cepa. Los tubos, sembrados e inoculados, se incubaban durante 3 meses en un "aparato de síntesis de ectomicorrizas" (Molina y Palmer, 1982). Durante este periodo de incubación, las plántulas se hacían crecer a temperatura ambiente (25 ± 5 °C) y bajo un fotoperiodo de 16 horas con una intensidad lumínica de $135 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. La temperatura de la zona radical se mantenía a 20-25 °C mediante un baño de agua en circulación. El crecimiento de los hongos en el sustrato y la presencia de contaminaciones accidentales se controlaban periódicamente por observación directa bajo la lupa binocular. Transcurrido el periodo de incubación, se extraían las plantas de los tubos de síntesis manteniendo intacto el sistema radical y se limpiaban de los restos de sustrato adherido a las raíces. Se determinaban las características macroscópicas de las ectomicorrizas formadas por cada especie fúngica (color, aspecto superficial, grado de desarrollo, patrón de ramificación y localización en el sistema radical) y se realizaban cortes transversales de las ectomicorrizas para determinar la presencia y el grado de formación del manto ectomicorrícico y la red de Hartig. Los aislados fúngicos que no formaban ectomicorrizas en cultivo puro se repetían una segunda vez para asegurar la fiabilidad de los resultados.

Especificidad por la planta hospedadora de distintos hongos ectomicorrícicos para P. pinaster.

El grado de especificidad por la planta hospedadora, de 16 especies de hongos ectomicorrícicos para *P. pinaster*, se determinó mediante síntesis en cultivo puro con 7 especies distintas de coníferas, incluyendo tanto especies nativas como introducidas en España (Tabla 2.4).

¹ d-Glucosa 2.50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.25 g, KH_2PO_4 0.50 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, CaCl_2 0.05 g, NaCl 0.025 g, Sequestrone 0.02 g, Tiamina (HC1) 100 μg , H_2O destilada 1 L, pH = 5.5

La preparación de los cultivos líquidos de cada hongo y los tratamientos de desinfección y germinación de semillas aplicados a cada especie vegetal, fueron los mismos ya especificados en los apartados anteriores. La técnica de síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro y las condiciones experimentales fueron también idénticas a las especificadas anteriormente.

Se establecieron cuatro repeticiones para cada combinación entre hongo y planta hospedadora. Transcurridos tres meses de incubación en el aparato de síntesis, se tomaron los datos de micorrización de cada una de las plantas.

Tabla 2.4

Especies fúngicas y vegetales utilizadas para determinar el grado de especificidad por la planta hospedadora de distintos hongos ectomicorrícicos para *P. pinaster*.

Hongo y número de cultivo	Planta
<i>Amanita aspera</i> A-48	<i>Picea abies</i> (L.) Karsten ¹
<i>Amanita muscaria</i> A-17	<i>Pinus contorta</i> Dougl. ex Loud. ²
<i>Hebeloma cylindrosporum</i> S-20	<i>Pinus halepensis</i> Miller ³
<i>Laccaria bicolor</i> S-238	<i>Pinus nigra</i> Arnold ⁴
<i>Laccaria laccata</i> A-127	<i>Pinus pinaster</i> Ait. ⁵
<i>Lactarius deliciosus</i> A-120	<i>Pinus ponderosa</i> Dougl. ex Laws ²
<i>Paxillus involutus</i> A-87	<i>Pinus radiata</i> D. Don. ²
<i>Rhizopogon ellenae</i> 8974	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco ²
<i>Rhizopogon luteolus</i> A-5	
<i>Rhizopogon roseolus</i> A-96	
<i>Rhizopogon vulgaris</i> A-101	
<i>Scleroderma citrinum</i> A-37	
<i>Suillus bovinus</i> A-75	
<i>Suillus luteus</i> A-33	

1 Semillas procedentes de Francia

2 Semillas procedentes de Oregón (USA)

3 Semillas procedentes de la costa mediterránea de la Península Ibérica

4 Semillas de *P. nigra* subsp. *taricio* var. *corsicana*, procedentes de Córcega

5 Semillas procedentes del noroeste de la Península Ibérica

Resultados

Síntesis de ectomicorrizas con P. pinaster.

De un total de 97 hongos potencialmente ectomicorrícicos, 57 aislamientos, pertenecientes a 35 especies distintas, demostraron su capacidad para formar ectomicorrizas con *P. pinaster* en condiciones de síntesis en cultivo puro (Tabla 2.5).

Se da a continuación una breve descripción de las principales características macroscópicas y microscópicas de las ectomicorrizas formadas por cada una de estas especies.

Amanita aspera + P. pinaster

Ectomicorrizas de color blanco, algunas con tonalidades beige claro, raramente simples, generalmente dicótomas o varias veces ramificadas dicotómicamente, con una longitud de entre 1 y 2 mm. La superficie del manto ectomicorrícico presentaba un aspecto liso y compacto. La red de Hartig, bien formada en toda la longitud de la micorriza, penetraba entre las dos primeras capas de células corticales. No se observaba la presencia de micelio extramatricial, ni la formación de cordones miceliares ni rizomorfas. Se establecieron puntos de infección, con formaciones discontinuas de manto y red de Hartig, a lo largo de algunas raíces laterales.

Amanita citrina + P. pinaster (Fig 2.1 a)

Ectomicorrizas de color blanco, simples, dicótomas o varias veces bifurcadas, hasta formar estructuras muy ramificadas de aspecto coraloide, con una longitud de entre 1 y 7 mm. La red de Hartig penetraba hasta la primera capa de células corticales. El manto fúngico, grueso, presentaba un aspecto entre aterciopelado y algodonoso, con abundante crecimiento de micelio extramatricial en el sustrato, numerosos cordones miceliares y abundantes rizomorfas.

Amanita muscaria + P. pinaster (Fig 2.1 b)

Ectomicorrizas simples o dicótomas, algunas doblemente dicótomas, con una longitud entre 1 y 3 mm y localizadas preferentemente en la zona

Tabla 2.5

Porcentajes de micorrización, obtenidos mediante síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro, entre distintos aislamientos fúngicos y *P. pinaster*.

Espece fúngica	nº de cultivo	Micorrizas (%)
<i>Amanita aspera</i>	A-48	71
<i>Amanita citrina</i>	A-157	76
<i>Amanita muscaria</i>	A-17	46
	A-124	38
	A-151	58
	A-67	27
<i>Amanita pantherina</i>	A-149	62
<i>Amanita rubescens</i>	A-73	45
	A-148	75
<i>Amanita spissa</i>	A-150	13
<i>Cenococcum geophilum</i>	A-144	9
<i>Collybia maculata</i>	A-65	42
<i>Cortinarius glaucopus</i>	A-125	40
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	S-66	25
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	S-20	86
<i>Hebeloma sinapizans</i>	A-126	56
<i>Hebeloma subsaponaceum</i>	S-68	69
<i>Laccaria bicolor</i>	S-238	89
<i>Laccaria laccata</i>	A-127	79
<i>Laccaria proxima</i>	S-64	32
<i>Lactarius chrysorrheus</i>	A-156	60
<i>Lactarius deliciosus</i>	A-81	29
	A-120	75
	A-159	46
<i>Lactarius rufus</i>	A-34	40
<i>Lyophyllum decastes</i>	A-71	64
<i>Melanogaster ambiguus</i>	A-132	38
<i>Paxillus involutus</i>	A-41	8
	A-87	52
		... / ...

Tabla 2.5 (Cont.)

<i>Pisolithus tinctorius</i>	A-93	81
	A-141	35
<i>Rhizopogon ellena</i>	8974	81
<i>Rhizopogon luteolus</i>	A-5	66
	A-106	15
	G-823	95
<i>Rhizopogon roseolus</i>	A-7	55
	A-96	53
	A-160	17
	M-1	53
	M-2	60
<i>Rhizopogon vulgaris</i>	A-56	70
	A-98	44
	A-101	52
<i>Scleroderma citrinum</i>	A-37	75
<i>Suillus bovinus</i>	A-21	35
	A-22	19
	A-75	58
<i>Suillus collinitus</i>	I-1	80
<i>Suillus granulatus</i>	A-140	65
<i>Suillus luteus</i>	A-33	52
	A-57	33
	A-155	77
<i>Suillus variegatus</i>	A-142	74
<i>Thelephora terrestris</i>	R-34	32
	R-38	8
	S-63	30
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	A-147	17

Los porcentajes de micorrizaci3n presentados en la tabla representan la media de cuatro repeticiones por aislamiento fúngico.

Se destacan en negrilla las especies fúngicas para las que se consigui3 la síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro y que no habian sido citadas anteriormente con *P. pinaster*, o cuyo caracter ectomicorrícico no había sido demostrado experimentalmente con esta especie vegetal.

superior del sistema radical. El manto fúngico, grueso y de color blanco, presentaba un aspecto aterciopelado, algunas veces algodonoso. Red de Hartig bien formada, que penetraba entre las dos primeras capas celulares del córtex radicular. Escaso crecimiento micelial en el sustrato, pero formación de abundantes rizomorfos, generalmente adosados a la raíz.

Amanita pantherina + *P. pinaster* (Fig 2.1 c)

Ectomicorrizas de color blanco, simples, dicótomas o varias veces dicótomas, de diámetro claramente engrosado con respecto a las raicillas no infectadas, 1 - 8 mm de longitud y localizadas casi exclusivamente en la parte superior del sistema radical. Manto de aspecto liso y compacto en las ectomicorrizas más jóvenes, luego aterciopelado, sin formación de micelio extramatricial. Abundantes rizomorfos que crecían adosados a la raíz.

Amanita rubescens + *P. pinaster* (Fig 2.1 d)

Ectomicorrizas de color blanco, simples, generalmente dicótomas, algunas doblemente dicótomas, de 1 - 8 mm de longitud y localizadas en la mitad superior del sistema radical. Manto fúngico de aspecto liso o aterciopelado, sin formación de micelio extramatricial. Abundantes cordones y rizomorfos que se desarrollaban adosados a la raíz.

Amanita spissa + *P. pinaster* (Fig 2.1 e)

Ectomicorrizas blancas, entre 1 y 2 mm de longitud, generalmente simples, algunas dicótomas. Manto de aspecto algodonoso y compacto. La red de Hartig, bien formada, penetraba hasta la segunda capa de células corticales. Presentaban escasos cordones miceliares y rizomorfos que crecían adheridas a lo largo de las raíces laterales. El crecimiento micelial en el sustrato era muy escaso.

Cenococcum geophilum + *P. pinaster*

Ectomicorrizas simples y cortas, no superiores a 1 mm de longitud. Manto fúngico de color negro y aspecto hirsuto, con hifas negras y rígidas, de 1 a 1.5 mm de longitud, que se proyectaban radialmente a la superficie de la micorriza. El hongo penetraba la capa epidérmica y la red de Hartig se

extendía entre algunas células de la primera capa cortical. No presentaban cordones miceliales ni rizomorfias. El crecimiento micelilar en el substrato era escaso, aunque localmente abundante alrededor de la raíz principal de algunas plantas.

Collybia maculata + *P. pinaster* (Fig 2.1 f)

Ectomicorrizas simples o dicótomas, entre 1 y 3 mm de longitud, que se localizaban dispersas por todo el sistema radical, aunque se distribuían preferentemente en la mitad superior. El manto fúngico, de color blanco, presentaba un aspecto algodonoso, con abundante micelio externo formado por hifas finas y laxas que agregaban partículas de substrato a su alrededor. La red de Hartig penetraba hasta la primera o segunda capa cortical. No presentaban rizomorfias, aunque se detectaban algunos cordones miceliales, escasos y cortos.

Cortinarius glaucopus + *P. pinaster* (Fig 2.2 a)

Ectomicorrizas simples o dicótomas de 1 a 3 mm de longitud, localizadas exclusivamente en los 2/3 superiores del sistema radical. El manto fúngico, de color blanco, presentaba un aspecto algodonoso, compacto y con abundante crecimiento micelilar. La red de Hartig se extendía hasta la tercera capa del córtex radical. El crecimiento del micelio del hongo en el substrato fue muy abundante, presentando numerosos cordones miceliales y algunas rizomorfias.

Hebeloma crustuliniforme + *P. pinaster* (Fig 2.2 b)

Ectomicorrizas de color blanco, simples o dicótomas, algunas doblemente bifurcadas, de 1 a 12 mm de longitud y claramente engrosadas con respecto a las raicillas no micorrizadas. Dispersas por todo el sistema radical. Presentaban un aspecto liso y mucilaginoso en estados juveniles, luego algodonoso, con abundante micelio externo, fino y laxo, que agregaba gran número de partículas de substrato alrededor de las raíces. El manto de la micorriza era muy grueso, formado por numerosas capas de hifas, entre las que habían quedado atrapadas células de la epidermis radical. La red de

Hartig penetraba toda la zona del córtex radical. El crecimiento del hongo en el substrato era muy abundante, pero no se presentaban cordones miceliares ni rizomorfias.

Hebeloma cylindrosporum + *P. pinaster* (Fig 2.2 c)

Ectomicorrizas blancas, simples, dicótomas o varias veces bifurcadas, de 1 a 5 mm de longitud. De aspecto algodonoso y rodeadas por un abundante micello, fino y laxo, que compactaba y agregaba el substrato alrededor de la raíz. El manto de la micorriza, muy grueso, estaba formado por numerosas capas de hifas, entre las que aparecían células vegetales separadas de la epidermis radical. La red de Hartig penetraba entre todas las capas del córtex radical, separando claramente unas células de otras. El crecimiento del hongo en el substrato no era muy abundante y se concentraba especialmente en la zona rizosférica.

Hebeloma sinapizans + *P. pinaster* (Fig 2.2 d)

Ectomicorrizas generalmente simples, algunas dicótomas, de 1 a 7 mm de longitud. Lisas y mucilaginosas en estado juvenil, luego blancas, de manto algodonoso, con abundante micello externo de hifas finas y laxas. La red de Hartig se extendía hasta la primera o segunda capa de células corticales. No se presentaban cordones miceliares ni rizomorfias, pero sí un abundante crecimiento del hongo en el substrato.

Hebeloma subsaponaceum + *P. pinaster* (Fig 2.2 e)

Ectomicorrizas generalmente simples, aunque también dicótomas y doblemente bifurcadas, de 1 a 2 mm de longitud y distribuidas por todo el sistema radical. Manto micorrícico de color blanco, algodonoso y con abundante micello externo, fino y laxo, que compactaba y agregaba el substrato alrededor de las raíces. La red de Hartig penetraba todas las capas del córtex radical. El crecimiento del hongo en el substrato era muy abundante, pero no presentaban ni cordones miceliares ni rizomorfias.

Laccaria bicolor + *P. pinaster* (Fig 2.2 f)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o varias veces dicótomas, de 1 a 8 mm de longitud, claramente engrosadas con respecto a las raíces no micorrizadas y distribuidas por todo el sistema radical. El manto micorrícico era liso y casi del mismo color que el resto de la raíz, pero presentaba un aspecto refringente y, en algunos casos, una coloración azul violácea en el extremo apical de las micorrizas. Las más adultas, presentaban también algunas zonas con un micelio blanco disperso en la superficie. La red de Hartig penetraba hasta la segunda o tercera capa del córtex radical. El crecimiento del hongo en el substrato era abundante, pero formado por un entramado de hifas finas y laxas, solo visibles al estereomicroscopio. No se presentaban ni cordones miceliarios ni rizomorfos.

Laccaria laccata + *P. pinaster* (Fig 2.3 a)

Ectomicorrizas simples o dicótomas, de 1 a 2 mm de longitud. De manto liso y del mismo color que la raíz, pero con aspecto refringente y, en algunos casos, una coloración azul violácea en el extremo terminal de la micorriza. Distribuidas por todo el sistema radical. La red de Hartig penetraba hasta la segunda capa del córtex radical. No presentaban ni cordones miceliarios ni rizomorfos.

Laccaria proxima + *P. pinaster*

Ectomicorrizas simples, dicótomas o doblemente bifurcadas. Manto liso y de color miel oscuro, similar al del resto de la raíz, ocasionalmente de aspecto mucilaginoso. De 1 a 10 mm de longitud y algo engrosadas respecto a las raíces no micorrizadas, se distribuían dispersas por todo el sistema radical. La red de Hartig penetraba entre la primera capa de células corticales. El crecimiento miceliar del hongo era especialmente abundante en la zona media del substrato. No se presentaban cordones ni rizomorfos.

Lactarius chrysorrheus + *P. pinaster*

Ectomicorrizas simples, algunas dicótomas, de manto liso y de color miel anaranjado. Cortas, de 1 a 1.5 mm de longitud y claramente engrosadas en

diámetro respecto a las raíces no micorrizadas. La red de Hartig penetraba hasta la primera capa de células corticales. Escaso crecimiento miceliar en el substrato, pero con la formación de algunos lactíferos de color amarillento.

Lactarius deliciosus + *P. pinaster* (Fig 2.3 b)

Ectomicorrizas simples, dicótomas, o doblemente bifurcadas, de 1 a 15 mm de longitud y dispersas por todo el sistema radical, pero principalmente localizadas en las raíces laterales de la parte superior. El manto, liso y de color miel anaranjado, presentaba en algunos casos coloraciones verdosas o verde oscuro, especialmente en la parte apical de la micorriza. La red de Hartig se desarrollaba hasta la segunda capa de células del córtex radical. Escaso crecimiento miceliar en el substrato, formado por hifas finas, hialinas y muy dispersas. Presentaban algunos lactíferos de color anaranjado.

Lactarius rufus + *P. pinaster* (Fig 2.3 c)

Ectomicorrizas de 1 a 6 mm de longitud, simples, dicótomas o varias veces bifurcadas, hasta formar estructuras coraloides. Localizadas preferentemente en el tercio superior del sistema radical. El manto era de aspecto liso y color rojizo, vinoso. La red de Hartig penetraba hasta la segunda capa de células corticales. El crecimiento miceliar en el substrato era muy tenue, solo visible al estereomicroscopio, y formado por hifas delgadas, hialinas y dispersas.

Lyophyllum decastes + *P. pinaster* (Fig 2.3 d)

Ectomicorrizas generalmente simples, algunas dicótomas o doblemente bifurcadas, de 1 a 10 mm de longitud y distribuidas por todo el sistema radical, aunque preferentemente en los 2/3 superiores. Manto ectomicorrístico de aspecto entre aterciopaleado y algodónoso, de color blanco con apariencia refringente. La red de Hartig penetraba hasta la segunda capa de células del cortex radical. No presentaban ni rizomorfos ni cordones micellares, aunque si un abundante crecimiento miceliar en el substrato.

Melanogaster ambiguus + *P. pinaster* (Fig 2.3 c)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o varias veces bifurcadas, de 1 a 7 mm de longitud y localizadas principalmente en la mitad superior del sistema radical. Manto compacto, con el aspecto de un denso entramado de hifas y de color beige dorado o marrón dorado. La red de Hartig se extendía en la primera capa de células corticales. A partir de las micorrizas, se irradiaba gran cantidad de micelio extramatricial y cordones miceliares que compactaban el substrato alrededor de las raíces.

Paxillus involutus + *P. pinaster*

Ectomicorrizas generalmente simples, algunas dicótomas, de 1 a 8 mm de longitud y localizadas generalmente en la mitad superior del sistema radical. Manto algodonoso y de color blanco a beige. La red de Hartig se extendía solo entre algunas células de la primera capa del córtex radical. Abundante crecimiento micellar en el substrato y tapizando el sistema radical.

Pisolithus tinctorius + *P. pinaster* (Fig 2.3 f)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o varias veces bifurcadas, formando estructuras coraloides muy ramificadas y compactas, de 1 a 10 mm de longitud. Se localizaban principalmente en la parte media y superior del sistema radical. Manto ectomicorrícico de color amarillo brillante, con el aspecto de un entramado de hifas en superficie. La red de Hartig penetraba hasta la segunda o tercera capa de células del córtex radical. Abundante producción de micelio externo, cordones miceliares y rizomorfos, que colonizaban todo el substrato.

Rhizopogon ellенаe + *P. pinaster* (Fig 2.4 a)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o doblemente bifurcadas, de 1 a 3 mm de longitud y localizadas en la mitad superior del sistema radical. Manto de color blanco, con aspecto entre aterciopelado y algodonoso compacto. La red de Hartig penetraba hasta la tercera capa de células corticales. Abundante producción de cordones miceliares y rizomorfos en el substrato.

Rhizopogon luteolus + *P. pinaster* (Fig 2.4 b)

Ectomicorrizas de 1 a 5 mm de longitud, generalmente dicótomas o varias veces bifurcadas, algunas simples, distribuidas por todo el sistema radical, pero principalmente en la zona superior. Manto de aspecto aterciopelado con micelio distribuido irregularmente, de color blanco a beige oscuro, con abundantes cordones miceliares y rizomorfas de color blanco a beige. La red de Hartig penetraba hasta la tercera capa de células corticales. El hongo producía gran cantidad de micelio en el substrato y alrededor de la raíz. Este micelio, de color beige a marrón, agregaba gran cantidad de partículas de substrato, uniéndolas al sistema radical.

Rhizopogon roseolus + *P. pinaster* (Fig 2.4 c)

Ectomicorrizas dicótomas o varias veces bifurcadas, algunas veces simples, de 1 a 5 mm de longitud y distribuidas en la mitad superior del sistema radical. Manto ectomicorrícico de aspecto algodonoso, a veces aterciopelado, y de color blanco, que en algunas micorrizas presentaba zonas discontinuas con tonalidades rosadas o salmón. La red de Hartig penetraba hasta la tercera capa celular del córtex radical. Abundante producción de micelio extramatricial que se desarrollaba en todo el substrato, con cordones miceliares y rizomorfas de color blanco rosado.

Rhizopogon vulgaris + *P. pinaster* (Fig 2.4 d)

Ectomicorrizas entre 1 y 3 mm de longitud, dicótomas o doblemente bifurcadas, distribuidas por todo el sistema radical. Manto de color blanco con algunas tonalidades rosadas, de aspecto aterciopelado o algodonoso. La red de Hartig se desarrollaba hasta la segunda capa de células corticales. Abundante producción de micelio externo, cordones miceliares y rizomorfas de color blanco.

Scleroderma citrinum + *P. pinaster* (Fig 2.4 e)

Ectomicorrizas de 2 a 7 mm de longitud, dicótomas o varias veces bifurcadas, formando estructuras coraloides muy ramificadas y compactas. Distribuidas por todo el sistema radical, aunque mucho más abundantes en la parte superior. Manto con aspecto superficial en entramado de hifas, de

color blanco brillante, con abundante micelio extramatricial, que compactaba el substrato alrededor de las raíces. Las hifas de la red de Hartig penetraban hasta la tercera capa de células del córtex radical. Presentaban numerosos cordones miceliares y rizomorfos, largas y de color blanco.

Suillus bovinus + *P. pinaster* (Fig 2.4 f)

Ectomicorrizas simples, algunas dicótomas, de 1 a 5 mm de longitud, distribuidas por la mitad superior del sistema radical. Manto ectomicorrícico de color blanco y aspecto algodonoso. La red de Hartig penetraba la primera capa del córtex radical. El micelio fúngico crecía abundantemente en la mitad superior del substrato, pero sin formar cordones ni rizomorfos, aunque tapizando gran parte de las raíces laterales.

Suillus collinitus + *P. pinaster* (Fig 2.5 a)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o doblemente bifurcadas, de 1 a 3 mm de longitud, distribuidas por todo el sistema radical. Manto ectomicorrícico de aspecto algodonoso y color blanco con tonalidades rosadas. La red de Hartig penetraba hasta la segunda capa de células corticales. Abundante producción de micelio externo y cordones miceliares, aunque no se observaban auténticas rizomorfos.

Suillus granulatus + *P. pinaster* (Fig 2.5 b)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o doblemente bifurcadas, de 1 a 3 mm de longitud, localizadas principalmente en la mitad superior del sistema radical. Manto de la micorriza de aspecto algodonoso compacto y de color blanco a beige, incluso marrón claro. La red de Hartig se desarrollaba hasta la tercera capa de células corticales. Producían gran cantidad de micelio externo, con cordones miceliares y rizomorfos de color blanco o beige.

Suillus luteus + *P. pinaster* (Fig 2.5 c)

Ectomicorrizas dicótomas o varias veces bifurcadas hasta formar estructuras muy ramificadas de aspecto coralolde. De 1 a 3 mm de longitud

y localizadas preferentemente en la mitad superior del sistema radical. Manto de la micorriza de color blanco y aspecto aterciopelado, con zonas más algodonosas dispersas. Formaban un abundante micelio externo con cordones miceliarios. Algunas rizomorfas, pero cortas y escasas. La red de Hartig penetraba la epidermis y la primera capa del córtex radical.

Suillus variegatus + *P. pinaster* (Fig 2.5 d)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o varias veces bifurcadas. De 1 a 3 mm de longitud y localizadas en casi todo el sistema radical, aunque con mayor frecuencia en su parte superior. Manto de la micorriza de color blanco y aspecto algodonoso. La red de Hartig penetraba hasta la segunda capa del córtex radical. Abundante micelio externo con cordones miceliarios y rizomorfas.

Thelephora terrestris + *P. pinaster* (Fig 2.5 e)

Ectomicorrizas simples, raramente dicótomas, de 1 a 4 mm de longitud. Dispersas por todo el sistema radical, pero más abundantes en la zona superior. Manto ectomicorrízico delgado, de una o dos capas de hifas, de aspecto liso o aterciopelado y color beige a blanco. La red de Hartig penetraba la primera capa de células corticales. Producían algunos cordones miceliarios, pero escasos y cortos.

Xerocomus chrysenteron + *P. pinaster* (Fig 2.5 f)

Ectomicorrizas simples, dicótomas o varias veces bifurcadas, de 1 a 7 mm de longitud y concentradas en la parte superior del sistema radical. El manto de la ectomicorriza presentaba un aspecto entre liso y aterciopelado, de color blanco refringente, casi gris perla, a marrón claro. Producían un abundante micelio externo y gran número de cordones miceliarios. Las hifas de la red de Hartig se desarrollaban hasta la segunda capa celular del córtex radical. Esta especie inició, en condiciones de síntesis axénica, jóvenes cuerpos fructíferos que no llegaron a desarrollarse totalmente.

Algunos hongos, como: *Rhizopogon hawkeri* S-274, *Rhizopogon subareolatus* A-104, A-116 y *Rhizopogon ventricisporus* A-97, llegaron a formar estructuras con aspecto de manto fúngico alrededor de raicillas simples o dicótomas. La frecuencia con que se formaban estas estructuras variaba entre el 3 % de las raíces cortas del sistema radical, en el caso de *R. hawkeri*, hasta el 10 ó el 14 % en los caso de *R. subareolatus* y *R. ventricisporus*. La observación microscópica de estas raíces revelaba la ausencia de una red de Hartig bien formada, por lo que no se consideraron auténticas simbiosis ectomicorrícicas.

Especificidad de los hongos ectomicorrícicos de P. pinaster frente a otras especies de coníferas.

El grado de micorrización obtenido entre distintas coníferas, nativas o exóticas, y varios aislamientos de hongos ectomicorrícicos, altamente infectivos para *P. pinaster*, se presentan en la Tabla 2.6.

Discusión

La técnica de síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro, desarrollada inicialmente por Mellin (1921, 1922), se ha considerado un método útil para determinar la capacidad ectomicorrícica de un hongo (Marx y Bryan, 1970), establecer el rango de simblontes fúngicos para varias especies vegetales (Trappe, 1967; Pachlewski y Pachlewska, 1974; Chu-Chou, 1979; Molina, 1979a, 1981; Kropp y Trappe, 1982; Malajczuk *et al.*, 1982; Richter y Bruhn, 1989) e identificar los micobiontes de las micorrizas naturales (Zak, 1973).

La aplicación de la técnica de síntesis de ectomicorrizas *in vitro* ha desarrollado un gran número de métodos y variaciones sobre los mismos, con una mayor o menor complicación en la manipulación de los elementos (Hacskeylo, 1953; Marx y Zak, 1965; Trappe, 1967; Molina, 1979a ; Fortin *et al.*, 1980, 1983; Chilvers *et al.*, 1986; Wong y Fortin, 1989; Boudarga *et al.*,

Tabla 2.6

Niveles de micorrización obtenidos mediante síntesis en cultivo puro entre distintos hongos ectomicorrícicos para *P. pinaster* y otras especies de coníferas.

Hongo	nº de cultivo	P.pin	P.hal	P.nig	P.rad	P.con	P.pon	P.abi	P.men
<i>Amanita aspera</i>	A-48	+++	?	++	+++	+	++	++	++
<i>Amanita muscaria</i>	A-17	++	++	nd	+++	+++	nd	+++	++
<i>Hebeloma cylindrosporium</i>	S-20	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Laccaria bicolor</i>	S-238	++++	nd	+++	++	nd	+++	nd	+++
<i>Laccaria laccata</i>	A-127	++++	nd	++++	+++	+++	+++	nd	+++
<i>Lactarius deliciosus</i>	A-120	++++	nd	+	+++	+++	-	++	-
<i>Lyophyllum decastes</i>	A-71	+++	+++	++	+++	+++	+++	nd	+++
<i>Paxillus involutus</i>	A-87	+++	nd	nd	++	++	+++	++	+++
<i>Pisolithus tinctorius</i>	A-93	++++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
<i>Rhizopogon ellenaee</i>	8974	++++	nd	?	-	-	+++	+	-
<i>Rhizopogon luteolus</i>	A-5	+++	nd	-	++	-	+++	+++	-
<i>Rhizopogon roseolus</i>	A-96	+++	+	?	?	nd	-	-	+
<i>Rhizopogon vulgaris</i>	A-101	+++	++	++	+++	-	+	++	+
<i>Scleroderma citrinum</i>	A-37	+++	+++	++++	+++	+++	++	+++	+++
<i>Suillus bovinus</i>	A-75	+++	+	+	+	nd	++	nd	+++
<i>Suillus luteus</i>	A-33	+++	-	++	?	-	+	-	?

Los números representan la media de 4 repeticiones. (nd) = no determinado; (-) = no micorrizado; (?) = menos de un 10% de las puntas radicales infectadas, manto y red de Hartig mal formadas; (+) = del 11 al 25 % de micorrización; (++) = del 26 al 50 % de micorrización; (+++) = del 51 al 75 % de micorrización; (++++) = del 76 al 100 % de micorrización.
P.pin = *Pinus pinaster*, P.hal = *P. halepensis*, P.nig = *P. nigra*, P.rad = *P. radiata*, P.con = *P. contorta*, P.pon = *P. ponderosa*, P.abi = *Picea abies*, P.men = *Pseudotsuga menziesii*.

1990). Los métodos de síntesis *in vitro* han sido criticados por su excesiva artificialidad. En algunos casos, se han observado algunas diferencias entre la simbiosis obtenida *in vitro* y las ectomicorrizas naturales (Zak, 1971), pero estudios más recientes han demostrado que, en otros casos, no existen diferencias significativas entre las micorrizas sintetizadas por distintos métodos (Brunner, 1991), ni entre las obtenidas por síntesis *in vitro* y las de origen natural (Kottke, 1986; Brunner *et al.*, 1991).

El método de síntesis utilizado en este trabajo, y descrito por Molina (1979a), es comparativamente más lento que otros, pero no requiere medios complejos y comporta una mínima manipulación, asegurando fácilmente el mantenimiento de las condiciones asépticas durante el proceso de síntesis. La presencia de una matriz sólida de vermiculita y turba, componentes habituales en los substratos utilizados para la producción de planta en contenedor, introduce el posible efecto morfogénico del substrato sobre la formación de las ectomicorrizas, eliminando algunas de las críticas imputadas a otros métodos de síntesis. Por otro lado, este método ha sido ampliamente utilizado en estudios de similares características y objetivos (Kropp y Trappe, 1982; Malajczuk *et al.*, 1982).

Las descripciones morfológicas presentadas en este trabajo no pretenden ser una clave para la identificación de las ectomicorrizas de *P. pinaster*. No obstante, algunas de las características descritas (color, aspecto superficial del manto, abundancia de micelio extramatricial, formación de rizomorfos,...) pueden ayudar a delimitar el género fúngico implicado en la simbiosis. A pesar de que se han hecho importantes intentos para la clasificación de las ectomicorrizas y la identificación de las especies fúngicas implicadas (Dominik, 1969; Zak, 1973; Agerer, 1987-1990), en la práctica, dicha identificación resulta extremadamente complicada si se pretende llegar a nivel de especie y conviene tener presentes ciertas consideraciones de importancia. El patrón de ramificación de la micorriza no puede tomarse como una característica distintiva y la presencia de raíces dicótomas no implica, ni siquiera, la existencia de ectomicorrizas. Aunque la ramificación de las raicillas cortas puede estar influenciada por la actividad del hongo ectomicorrícico (Browning y Whitney, 1991). Se ha demostrado que la formación de raíces dicótomas en *P. pinaster* esta determinada genéticamente

por la planta y pueden producirse sin que sea necesaria la presencia de ningún hongo, ya sea simbiótico o parásito (Faye *et al.*, 1981). Algunas características, como el color, consideradas útiles y estables en la caracterización de determinadas ectomicorrizas (e.g. *Cenococcum geophilum*), pueden variar, en otros casos, para una misma combinación planta-hongo (Trappe, 1967). Otras características, como las estructuras del manto y la red de Hartig, se mantienen estables en relación con la edad y las condiciones ambientales, y no varían con el método de síntesis utilizado (Brunner, 1991). La red de Hartig, no obstante, presenta muy pocas diferencias incluso entre especies fúngicas distintas (Blasius *et al.*, 1986), y como ya estableció Zak (1973) no contiene suficientes elementos distintivos como para ser una característica útil en la identificación de una micorriza.

Los resultados positivos obtenidos en la síntesis en cultivo puro (Tabla 2.5) demuestran la capacidad de estos hongos para formar ectomicorrizas con *P. pinaster*. Extraer otras conclusiones requiere una gran cautela.

La formación de ectomicorrizas en cultivo puro está afectada por los niveles de fósforo, nitrógeno y glucosa del medio (Gibson y Deacon, 1990), así como por el contenido hídrico del substrato (Stenström, 1991). En estas condiciones experimentales, la formación de un bajo porcentaje de micorrización sugiere que un hongo es menos infectivo que otros capaces de producir un alto porcentaje de micorrización. Esta información puede resultar de gran utilidad en la selección de hongos para la inoculación en vivero con cultivos miceliarios. No obstante, no podemos deducir que tales hongos no tengan un papel importante en condiciones naturales.

Los resultados negativos solo indican que las condiciones experimentales no eran las adecuadas para la formación de ectomicorrizas con los aislados utilizados para esas especies fúngicas. Así, ninguno de los aislamientos de los géneros *Boletus* y *Tricholoma*, utilizados en los experimentos de síntesis, inició la formación de ectomicorrizas con *P. pinaster*, a pesar de tratarse de géneros con algunos representantes ectomicorrícicos citados para *P. pinaster* (Tabla 2.1) y otras especies forestales (Kropp y Trappe, 1982; Malajczuk *et al.*, 1982). La imposibilidad de obtener ectomicorrizas formadas por especies de los géneros *Boletus* o *Tricholoma*, en condiciones de síntesis en cultivo puro, ha sido citada también con otras especies vegetales (Kropp,

1982a; Kropp y Trappe, 1982; Godbout y Fortin, 1983; Danielson *et al.*, 1984b). La falta de resultados positivos con estas especies fúngicas puede estar relacionada con el crecimiento extremadamente lento de estos hongos o con la edad de la planta. Se ha demostrado que la composición de especies ectomicorrícicas asociadas a una planta hospedadora varía con la edad de esta última (Deacon *et al.*, 1983; Mason *et al.*, 1983; Dighton y Mason, 1985) y por tanto, la síntesis *in vitro* no refleja todas las situaciones naturales, ya que se realiza utilizando plántulas. Las especies de *Boletus* y *Tricholoma* suelen fructificar en bosques y plantaciones asociados a árboles adultos, por lo que las condiciones de síntesis en cultivo puro pueden ser desfavorables a la expresión de su capacidad ectomicorrícica.

En otros casos, como el de algunos representantes del género *Lycoperdon* citados anteriormente como potenciales hongos ectomicorrícicos (Trappe, 1962), la falta de formación de micorrizas coincide con los resultados obtenidos con otras especies arbóreas (Riffle, 1973; Richter y Bruhn, 1989), lo que, unido a otras evidencias (Richter y Bruhn, 1989), hace pensar que se trata de especies más saprofiticas que micorrícicas.

La información obtenida de los resultados negativos nos permite eliminar a estos hongos como posibles candidatos para la inoculación de *P. pinaster* en vivero mediante las técnicas actualmente disponibles, pero no demuestra, de forma concluyente, que su asociación micorrícica con *P. pinaster* sea imposible en la naturaleza.

Los resultados obtenidos (Tabla 2.5) sugieren que *P. pinaster* es una especie con un amplio potencial ectomicorrícico, capaz de asociarse a un gran número de especies fúngicas, y con una baja especificidad por los simbiotes, ya que puede formar ectomicorrizas con aislamientos de hongos obtenidos en asociación con distintas especies arbóreas (*Abies* spp., *Castanea sativa*, *Corylus avellana*, *Pinus radiata*, *Pinus sylvestris*, *Pseudotsuga menziesii*, *Quercus* spp.). Muchos de los hongos capaces de formar un alto porcentaje de micorrización con *P. pinaster* (*Amanita* spp., *Hebeloma* spp., *Laccaria* spp., *P. tinctorius*, *S. citrinum*) son especies de amplio espectro, sin una marcada especificidad por la planta hospedadora (Trappe, 1962) (Tabla 2.6). Otros, en cambio (*L. deliciosus*, *Rhizopogon* spp., *Suillus* spp.), demuestran un mayor grado de selectividad por la especie

vegetal (Tabla 2.6). Para una especie pionera como *P. pinaster*, la capacidad de establecer ectomicorrizas con un amplio abanico de especies fúngicas puede tener importantes implicaciones ecológicas, ya que cuenta con una alta probabilidad de asociarse a algún simbiote ectomicorrícico que facilite su establecimiento natural en zonas recientemente deforestadas (e.g. invasión de zonas afectadas por incendios forestales). Una fuerte presión selectiva hacia el establecimiento de asociaciones más específicas sería contraria a la estrategia biológica de *P. pinaster*.

Actualmente, está totalmente aceptado que distintos hongos ectomicorrícicos, en distintas condiciones ambientales, producen distintos efectos sobre la planta. Por lo tanto, la selección de hongos ectomicorrícicos es un aspecto importante en la aplicación de la tecnología ectomicorrícica en la producción forestal (Bowen, 1965; Mikola, 1973; Trappe, 1977; Kropp y Langlois, 1990). Seguramente, las asociaciones ectomicorrícicas de *P. pinaster* presentadas en este trabajo no representan el total de la flora fúngica potencialmente micorrícica para esta especie forestal, pero ofrecen un buen punto de partida para la selección de hongos ectomicorrícicos aplicables a la micorrización controlada de *P. pinaster* en vivero.

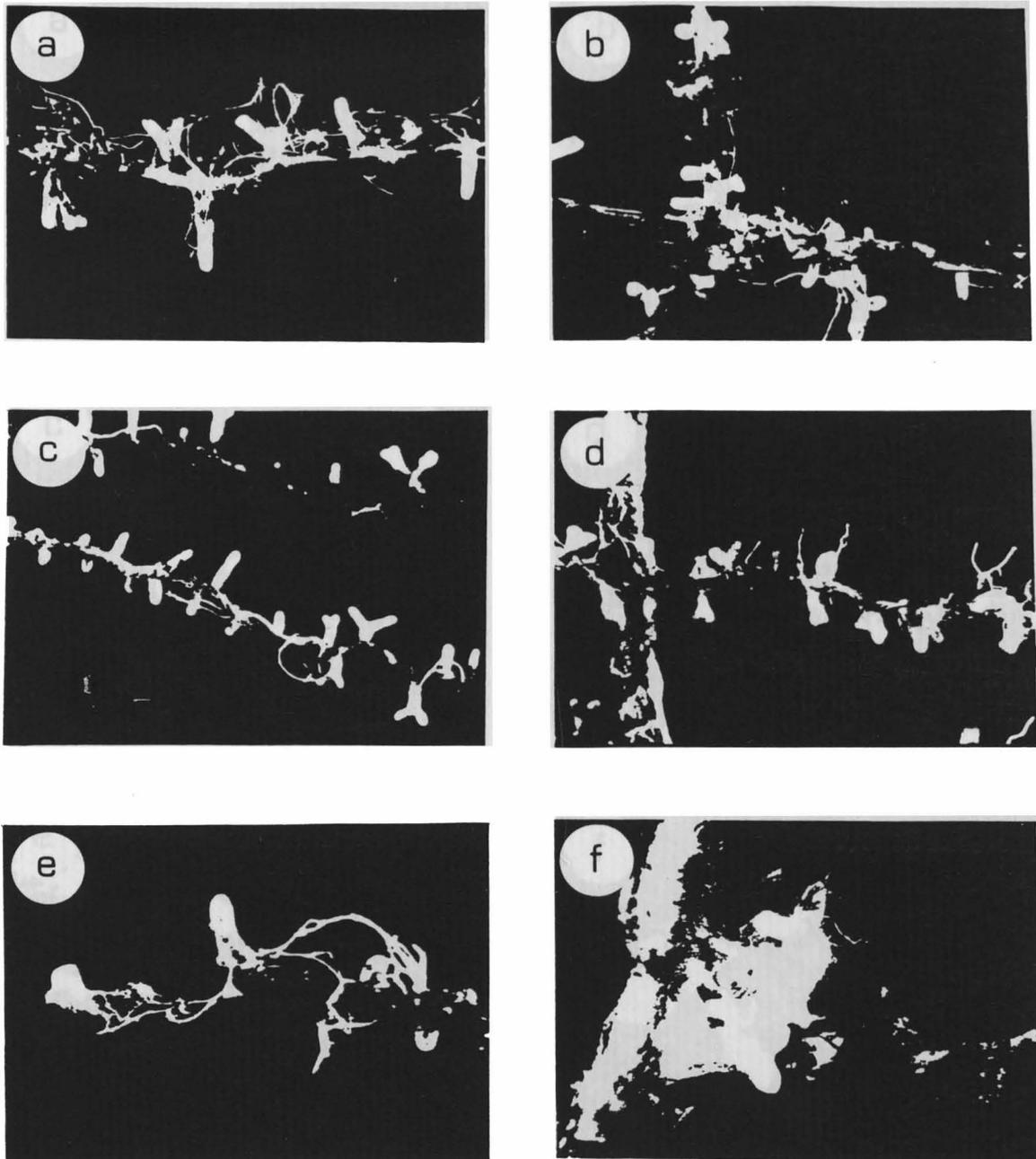


Fig 2.1 - Ectomicorrizas de *Pinus pinaster* obtenidas mediante síntesis en cultivo puro con : (a) *Amanita citrina*, (b) *Amanita muscaria*, (c) *Amanita pantherina*, (d) *Amanita rubescens*, (e) *Amanita spissa* y (f) *Collybia maculata*.

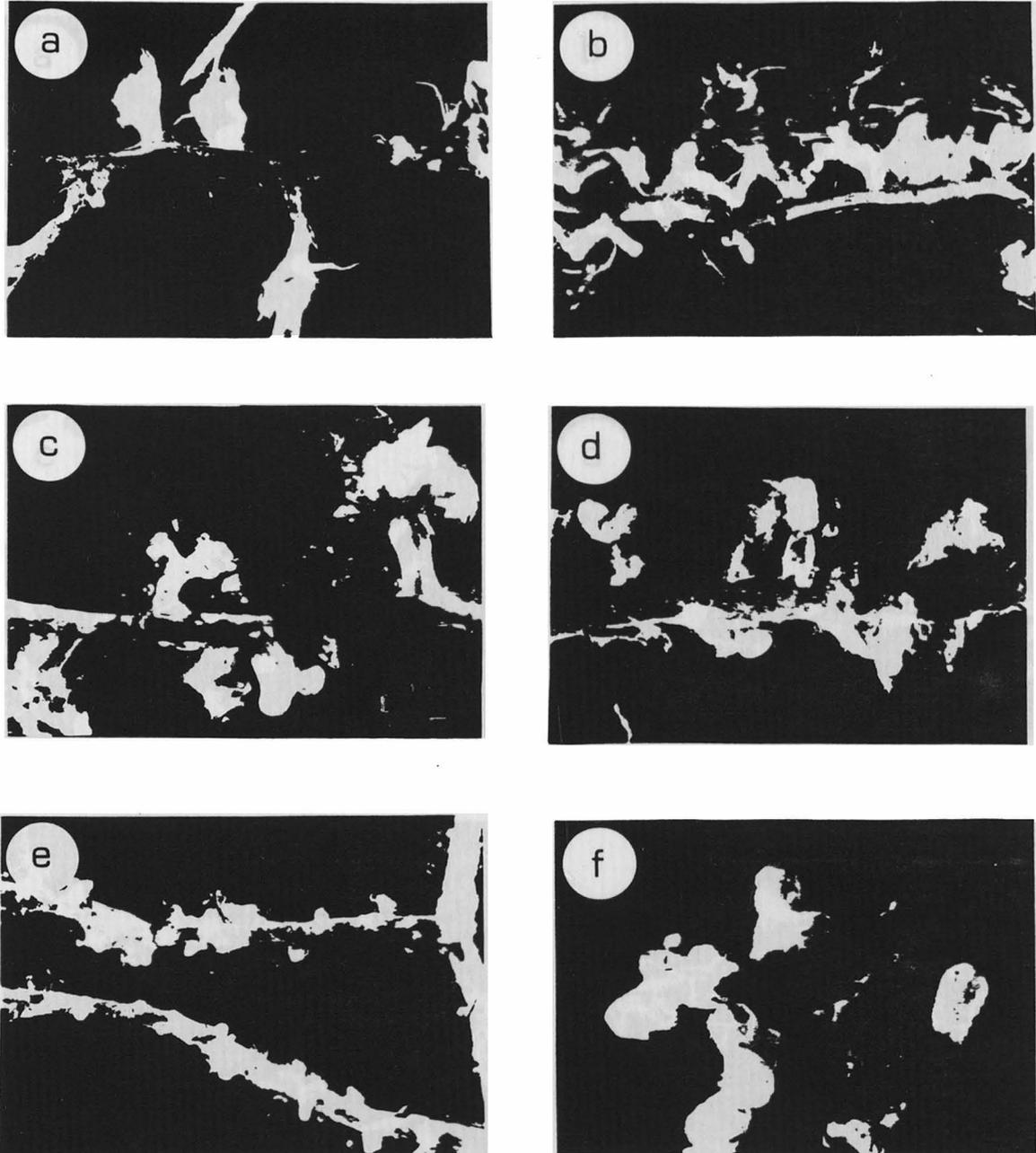


Fig 2.2 - Ectomicorrizas de *Pinus pinaster* obtenidas mediante síntesis en cultivo puro con : (a) *Cortinarius glaucopus*, (b) *Hebeloma crustuliniforme*, (c) *Hebeloma cylindrosporum*, (d) *Hebeloma sinapizans*, (e) *Hebeloma subsaponaceum* y (f) *Laccaria bicolor*.

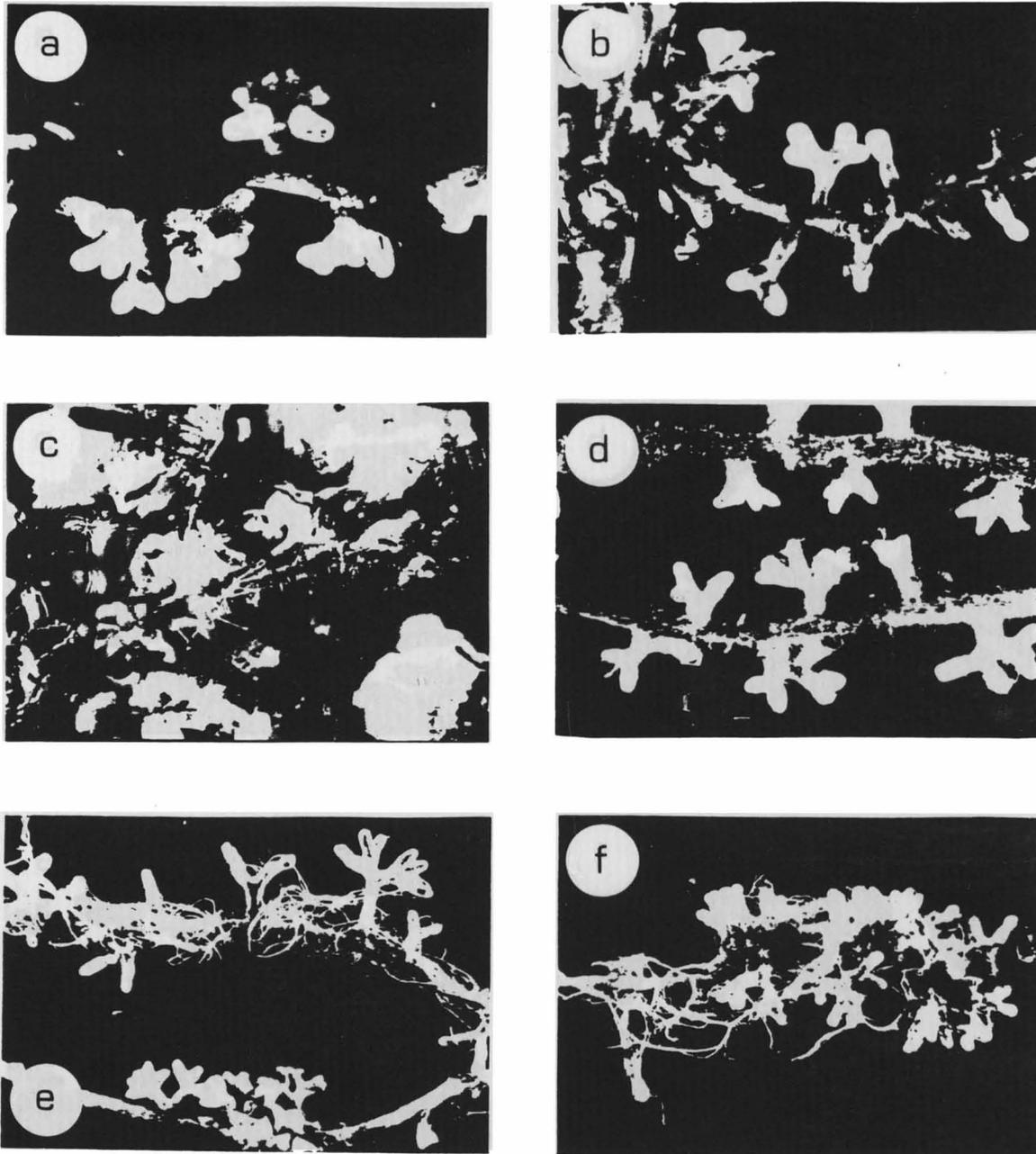


Fig 2.3 - Ectomicorrizas de *Pinus pinaster* obtenidas mediante síntesis en cultivo puro con : (a) *Laccaria laccata*, (b) *Lactarius deliciosus*, (c) *Lactarius rufus*, (d) *Lyophyllum decastes*, (e) *Melanogaster ambiguus* y (f) *Pisolithus tinctorius*.

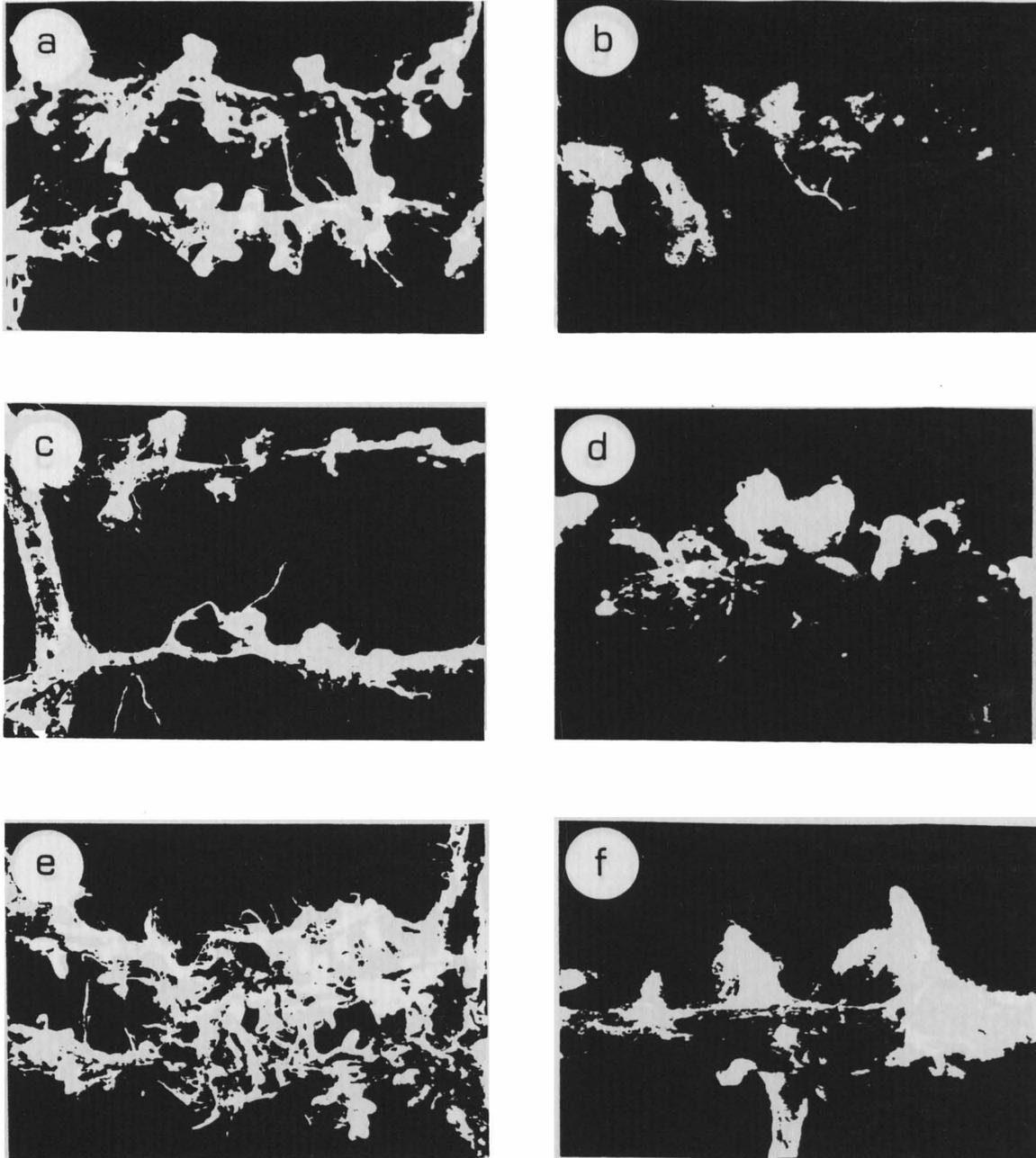


Fig 2.4 - Ectomicorrizas de *Pinus pinaster* obtenidas mediante síntesis en cultivo puro con : (a) *Rhizopogon ellенаe*, (b) *Rhizopogon luteolus*, (c) *Rhizopogon roseolus*, (d) *Rhizopogon vulgaris*, (e) *Scleroderma citrinum* y (f) *Suillus bovinus*.

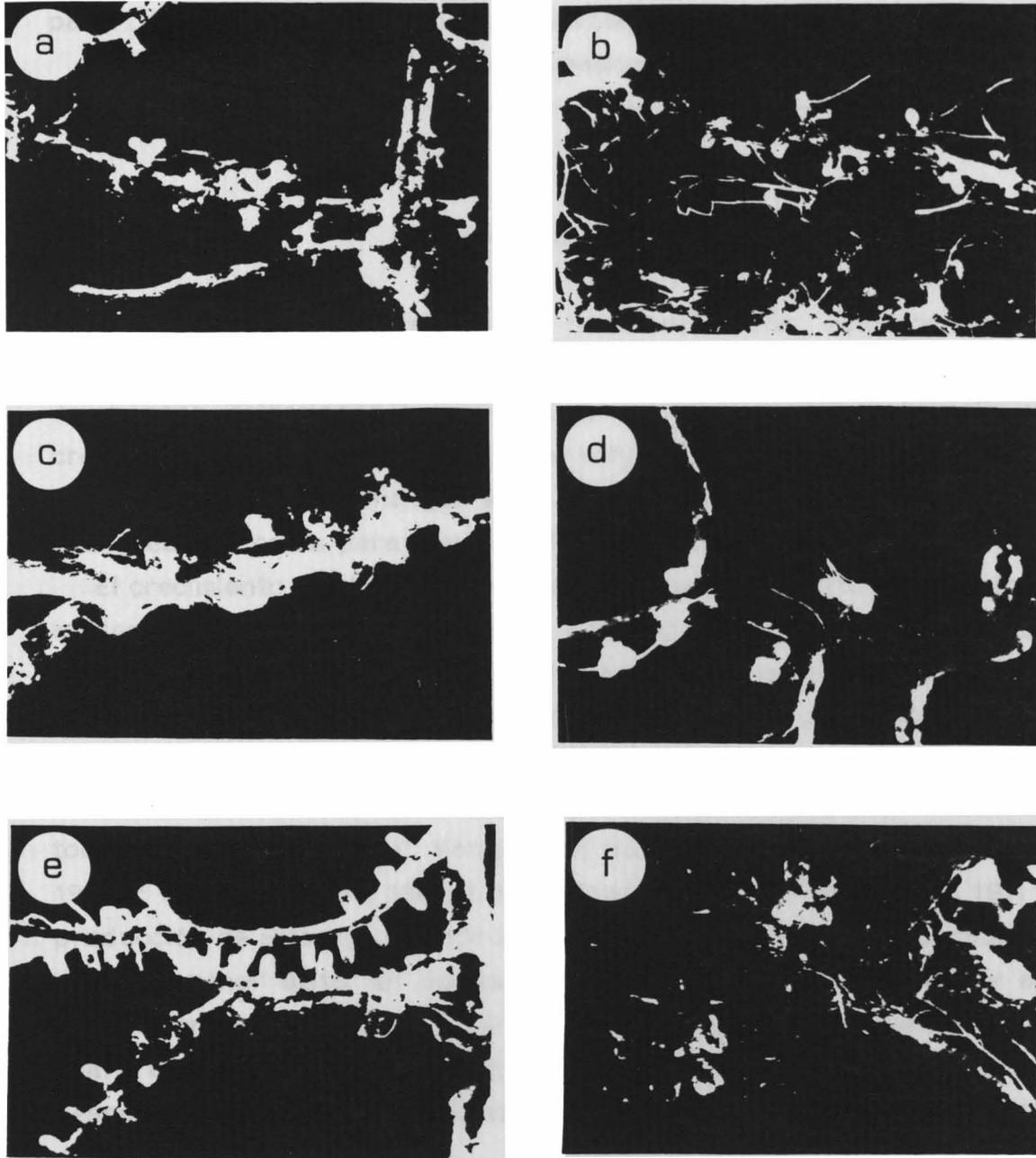


Fig 2.5 - Ectomicorrizas de *Pinus pinaster* obtenidas mediante síntesis en cultivo puro con : (a) *Suillus collinitus*, (b) *Suillus granulatus*, (c) *Suillus luteus*, (d) *Suillus variegatus*, (e) *Thelephora terrestris* y (f) *Xerocomus chrysenteron*.

Selección de hongos y evaluación de técnicas de inoculación para la micorrización controlada de *Pinus pinaster* en contenedor.

Introducción

El éxito de la aplicación de la investigación ectomicorrícica en reforestación dependerá, en gran medida, de la disponibilidad de un rango de hongos seleccionados capaces de mejorar la supervivencia y el crecimiento de las plantas en distintas condiciones ambientales. No obstante, la utilización de estos hongos será imposible si no se dispone de métodos prácticos y eficaces para la producción y aplicación de inóculo.

El crecimiento miceliar del hongo en un soporte sólido (turba-vermiculita) suplementado con solución nutritiva, y su incorporación al sustrato o suelo del vivero, ha sido uno de los métodos más utilizados para la producción y aplicación de inóculos ectomicorrícicos (Marx y Kenney, 1982; Harvey, 1991). Esta técnica de producción de inóculo ha sido adoptada universalmente y se ha utilizado con éxito para la inoculación de distintas especies forestales en todo el mundo (Marx, 1980; Mexal, 1980; Marx y Kenney, 1982; Cordell *et al.*, 1987a; Le Tacon *et al.*, 1988; Kropp y Langlois, 1990; Marx *et al.*, 1991). La producción de este tipo de inóculo a escala comercial ha sido abordada, con mayor o menor éxito, en países como Estados Unidos y Francia y se ha aplicado en la producción de plantas micorrizadas en viveros en contenedor (Marx *et al.*, 1982; Hung y Molina, 1986; Hung y Trappe, 1987) y a raíz desnuda (Marx *et al.*, 1984a) con las especies ectomicorrícicas *Pisolithus tinctorius* y *Laccaria bicolor*.

La inclusión del micelio fúngico en geles de polímeros inertes ha demostrado ser un método eficaz para la producción de inóculo ectomicorrícico (Le Tacon *et al.*, 1983, 1985; Mauperin *et al.*, 1987; Kuek *et al.*, 1992). En el caso de *L. bicolor* ha dado mejores resultados que el inóculo producido en turba-vermiculita (Mortier *et al.*, 1988), pero su extensión a otras especies fúngicas esta aun en vías de solución.

La inoculación con esporas no precisa de una fase de crecimiento en cultivo puro y su aplicación en vivero resulta sencilla. Esta técnica se ha utilizado para la micorrización de plantas producidas en contenedor o a raíz desnuda con esporas de *P. tinctorius* (Marx y Barnett, 1974; Marx, 1976; Marx *et al.*, 1976, 1978, 1979, 1984 *b* ; Ruehle y Marx, 1977; Ruehle, 1980; Azevedo, 1982; Marx y Kenney, 1982; Alvarez y Trappe, 1983; Marx y Bell, 1985) y distintas especies de *Rhizopogon* (Theodorou y Bowen, 1970, 1973; Theodorou, 1971; Lamb y Richards, 1974 *a, b*; Donald, 1975; Azevedo, 1982; Ivory y Munga, 1983; Parke *et al.*, 1983 *a*; Castellano y Trappe, 1985; Castellano *et al.*, 1985; Chu-Chou y Grace, 1985).

Los experimentos de micorrización controlada en la producción de *P. pinaster* en contenedor, abordados en este capítulo, perseguían dos grandes objetivos: (i) determinar el método de inoculación más adecuado para distintas especies de hongos ectomicorrícicos en condiciones de vivero y (ii) establecer la dosis de inóculo óptima para cada técnica de inoculación y cada una de las especies ectomicorrícicas seleccionadas.

Materiales y Métodos

Producción de P. pinaster en contenedor y condiciones de crecimiento de las plantas.

En todos los experimentos de inoculación se utilizaron semillas seleccionadas de *P. pinaster* procedentes de Las Landas (origen Aquitania, CEMAGREF, nº de lote 81245, CNRF, Francia). Las semillas se lavaban durante 12 horas en agua corriente en circulación y se desinfectaban por inmersión en H₂O₂ al 33% durante 30 min en agitación (Barnett, 1976). Una vez desinfectadas se lavaban con un volumen suficiente de agua destilada estéril y se distribuían en placas Petri que se sellaban con Parafilm^R. Estas semillas se estratificaban a 4 °C durante 30-40 días.

Todas las plantas se cultivaban en contenedores Sherwood de 175 cm³ de capacidad (Rootainers^R, Spencer-Lemaire Ind.; Edmonton, Alberta, Canadá). Antes de su utilización, los contenedores se desinfectaban por inmersión en lejía al 20 %.

El sustrato de crecimiento estaba constituido por: turba de Sphagnum (Floratorf[®] 300) tamizada (2 mm de tamaño de partícula) y vermiculita (Termita[®]) grado 2 (2 mm de tamaño de partícula), mezcladas en una proporción 1:1 (v:v) (Owston, 1972; Barnett, 1974; Tinus, 1974), con un pH final de 5.5. Todo el sustrato utilizado en los distintos experimentos se esterilizaba al autoclave (120 °C, 60 min).

Las plantas se regaban en función de las necesidades y se fertilizaban cada tres semanas dispensando 10 ml por planta de una disolución en agua de: 2.15 g/l de Kristalon[®] (NPK: 17-6-18) (Shell), 0.24 g/l de Hortrilon[®] (BASF) y 0.18 g/l de Fetrilon[®] (BASF), acidificada a pH 5.5 con una disolución al 10 % de HNO₃. En cada fertilización, el aporte de nutrientes (mg/planta) era: 3.65 N, 1.29 P, 3.87 K, 0.35 Fe, 0.07 Mg, 0.06 Cu, 0.06 Mn, 0.01 B, 0.01 Mo y 0.01 Zn.

En todos los experimentos, las plantas se cultivaban en un invernadero de cristal climatizado y sombreado con una malla blanca del 40 %. El control de temperatura se estableció en un máximo de 25-27 °C y un mínimo de 18-20 °C, mantenido por un sistema de refrigeración en circuito cerrado y un sistema de calefacción central por conducción de agua caliente. La humedad relativa se mantenía siempre por encima del 40 % mediante un sistema automático de pulverización de agua (Defensor[®]) alimentado por un destilador (Kottermann[®] 1032). La intensidad lumínica, a nivel de la banqueta del invernadero y a plena radiación solar, oscilaba entre 700 y 800 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (400-700 nm) y se aseguraba un fotoperíodo de 16 horas/día mediante lámparas de sodio de alta presión, que proporcionaban una intensidad lumínica mínima de 200 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (400-700 nm) a nivel de la masa foliar de las plantas.

Técnicas de inoculación y dosificación de inóculo ectomicorrízico.

Inoculaciones con micelio producido en sustrato de turba-vermiculita.

Preparación del inóculo.

La producción de inóculo micelial en sustrato de turba-vermiculita se hizo siguiendo la técnica descrita por Marx y Bryan (1975) con algunas

modificaciones. Las cepas fúngicas, aisladas en cultivo puro, se transferían de la colección de cultivos a placas Petri con medio de cultivo agar Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969) y se incubaban a 25 °C durante 30 días. A partir de las colonias obtenidas, se transferían 15 discos de micelio de 5 mm de diámetro a frascos con tapón de rosca que contenían 70 ml de medio líquido MMN estéril (120 °C, 15 min). Los cultivos líquidos se incubaban a 25 °C durante 15-40 días (según la rapidez de crecimiento del hongo) y se agitaban cada 5-7 días para fragmentar el micelio y conseguir un crecimiento disperso y uniforme.

El sustrato para la producción de los inóculos se preparaba en frascos de tapón de rosca de 2 l de capacidad. Cada frasco contenía 1100 ml de vermiculita (Termita^R, Asfaltex S.A.) grado 2 (2 mm de tamaño de partícula), 100 ml de turba de Sphagnum (Floratorf^R 300) tamizada (2 mm de tamaño de partícula) y 600 ml de medio líquido MMN modificado. Los componentes se mezclaban por agitación y los frascos preparados se autoclavaban a 120 °C durante 20 min.

A cada frasco se transferían, asépticamente, 140 ml de cultivo líquido del hongo que se quería producir y se incubaban a 25 °C hasta que se conseguía un crecimiento total en todo el sustrato del inóculo (30-60 días). Transcurrido el período de incubación, el inóculo estaba listo para ser usado mediante su incorporación al sustrato de cultivo de las plantas que se querían inocular.

Selección de cepas ectomicorrícicas para su aplicación en forma de inóculo micelial en turba-vermiculita.

Se preparaban 2 l de inóculo micelial para cada una de las 19 cepas fúngicas preseleccionadas por su capacidad ectomicorrícica con *P. pinaster* (Tabla 3.1). Cada uno de los inóculos se mezclaba con 6 l de sustrato (turba-vermiculita; 1:1, v:v) desinfectado (120 °C, 60 min) para obtener una dosis alta de inoculación (1:4, v:v) y se distribuía en 32 contenedores por especie fúngica. Los tratamientos se repartieron en cinco grupos y se prepararon 32 controles con el mismo sustrato sin inocular para cada uno de los grupos. Se sembraban tres semillas de *P. pinaster*, desinfectadas y estratificadas, por contenedor. Una vez germinadas, se dejaba una sola

planta por contenedor y se cultivaban en las condiciones especificadas anteriormente.

A partir de 4 meses de crecimiento y a intervalos de 15 días (Tabla 3.3), se recogían los grupos de plantas, se lavaba el sistema radical para liberarlo del substrato de cultivo, y se tomaban los datos del diámetro y la altura del tallo, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte radical de cada una de las plantas. Los porcentajes de micorrización se determinaban por recuento directo, a la lupa binocular, de tres muestras tomadas al azar del sistema radical de cada planta. En cada muestra se contaban un total de 100 a 200 raíces cortas.

Tabla 3.1

Cepas ectomicorrícicas probadas en forma de inóculo miceliar producido en un substrato de turba-vermiculita

Espece fúngica	NO de cepa
<i>Amanita aspera</i>	A-48
<i>Amanita muscaria</i>	A-17
<i>Amanita rubescens</i>	A-77
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	S-66
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	S-20
<i>Laccaria bicolor</i>	S-238
<i>Laccaria laccata</i>	A-127
<i>Lyophyllum decastes</i>	A-71
<i>Paxillus involutus</i>	A-87
<i>Pisolithus tinctorius</i>	A-93
<i>Rhizopogon ellenae</i>	9874
<i>Rhizopogon luteolus</i>	A-5
<i>Rhizopogon roseolus</i>	A-96
<i>Rhizopogon vulgaris</i>	A-101
<i>Scleroderma citrinum</i>	A-37
<i>Suillus bovinus</i>	A-75
<i>Suillus granulatus</i>	A-140
<i>Suillus luteus</i>	A-33
<i>Suillus variegatus</i>	A-142

Las características de cada una de las cepas y su capacidad ectomicorrícica con *P. pinaster* se encuentran detalladas en las Tablas 2.2, 2.3 y 2.5 del capítulo anterior: "Hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* en el norte de España".

La significación de las diferencias entre tratamientos se determinaba por análisis de la varianza y se utilizaba el test de clasificación múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de las medias.

Determinación de la dosis óptima de inóculo para las cepas seleccionadas.

Siguiendo la metodología antes descrita, se prepararon 5 l de inóculo miceliar en turba-vermiculita para cada una de las cepas ectomicorrícicas seleccionadas en el experimento anterior: *H. crustuliniforme* S-66, *L. bicolor* S-238, *L. laccata* A-127, *L. decastes* A-71 y *P. tinctorius* A-93.

El inóculo de cada una de las especies fúngicas se mezclaba con substrato de turba-vermiculita (1:1, v:v) desinfectado (120 °C, 60 min) estableciendo cinco dosis de inoculación : 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 (inóculo:substrato, v:v). Se preparaban 64 contenedores por dosis y se sembraban tres semillas de *P. pinaster*, desinfectadas y estratificadas, en cada contenedor. Una vez germinadas, se dejaba una sola planta por contenedor, se distribuían totalmente al azar en el invernadero y se cultivaban en las condiciones especificadas anteriormente.

Después de 20 semanas de crecimiento, se recogían diez plantas al azar por tratamiento, se lavaba el sistema radical para liberarlo del substrato de cultivo, y se tomaban los datos del diámetro y la altura del tallo, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte radical de cada una de las plantas. Los porcentajes de micorrización se determinaban por recuento directo, a la lupa binocular, de tres muestras tomadas al azar del sistema radical de cada planta. En cada muestra se contaban un total de 100 a 200 raíces cortas.

La significación de las diferencias entre tratamientos se determinaba por análisis de la varianza y se utilizaba el test de clasificación múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de las medias. Para homogeneizar la varianza del error experimental, los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación angular de los datos antes de someterlos al análisis estadístico ($\text{sen}^{-1} (\%/100)^{-2}$) (Little y Hills, 1978; Snedecor y Cochran, 1980; Steel y Torrei, 1980).

Inoculaciones con micelio incluido en alginato polimerizado.

Preparación del inóculo.

Las cepas ectomicorrícicas se transferían del banco de cultivos a placas con medio MMN y se incubaban a 25 °C durante 15-30 días. A partir de las colonias obtenidas, se recortaban discos de micelio de 5 mm de diámetro que se transferían a erlenmeyers de 300 ml de capacidad con 100 ml de medio líquido MMN estéril, a razón de 5 discos de micelio por erlenmeyer y 12 erlenmeyers por especie fúngica. Los cultivos líquidos se incubaban a 25 °C durante 20-30 días. Para *L. bicolor* S-238 y *L. decastes* A-71, se obtenían mejores resultados si la incubación se realizaba en un baño termostático con agitación orbital, mientras que para *P. tinctorius* A-93 y *R. roseolus* A-96, la incubación en cultivo estático ofrecía un mejor crecimiento micellar.

Después del período de incubación se recogía el micelio producido mediante filtración a través de gasa esterilizada (120 °C, 15 min) y se lavaba con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo. En condiciones asépticas, se separaban 23 g (peso fresco)¹ de micelio para cada una de las especies fúngicas, se resuspendían en 100 ml de agua destilada estéril y se trituraban en una batidora Waring^R durante 25 segundos.

Se preparaba una solución estéril (120 °C, 20 min) de alginato de sodio (SOBALG FD 100, 174) al 2 % en agua destilada y, una vez atemperada, se añadían 40 g de turba de Sphagnum esterilizada (0.25 mm de tamaño de partícula) por litro de solución de alginato. La suspensión de micelio triturado se diluía a 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 en agua destilada estéril. Se tomaban 50 ml de cada una de las suspensiones y se mezclaban con 400 ml de solución de alginato para preparar cinco concentraciones de inóculo: 2.00, 1.00, 0.50, 0.25 y 0.12 g de micelio (peso seco)/ l de alginato. Las suspensiones de micelio en alginato se mantenían en agitación y, en condiciones asépticas, se dispensaban gota a gota sobre una disolución estéril (120 °C, 15 min) 0.7 M de CaCl₂. Las bolas de alginato (de 3 a 4 mm de diámetro), totalmente polimerizadas y con el micelio fúngico incluido en su interior, se conservaban a 4 °C en bolsas de plástico cerradas.

¹

23 g de peso fresco de micelio representaban aproximadamente 2 g de micelio en peso seco

Determinación de la dosis óptima de inóculo.

Se preparaban 450 ml de inóculo incluido en alginato para cada dosis de micelio (2.00, 1.00, 0.50, 0.25 y 0.12 g de micelio / l de alginato) y cada una de las cuatro especies fúngicas. Cada inóculo se mezclaba con 5.5 l de sustrato de turba-vermiculita (1:1, v:v) desinfectado, obteniendo las dosis de inoculación de: 150, 75, 37, 19 y 9 mg de micelio (peso seco) / l de sustrato. Se llenaban 32 contenedores por dosis de inóculo y especie fúngica. Para *L. bicolor* S-238 se realizó un segundo experimento en el que se preparaban 2.5 l de alginato con una concentración de micelio de 1 g (peso seco)/ l de alginato. El inóculo se mezclaba con sustrato desinfectado de turba-vermiculita (1:1, v:v) en las proporciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 (inóculo:sustrato, v:v), para obtener las dosis de inoculación de: 520, 260, 130, 65, 33 y 16 mg de micelio (peso seco)/ l de sustrato, y se llenaban 32 contenedores para cada dosis de inoculación. En cada uno de los contenedores se sembraban tres semillas de *P. pinaster*, desinfectadas y estratificadas. Una vez germinadas, se dejaba una sola planta por contenedor y se distribuían totalmente al azar en el invernadero. Las plantas se mantuvieron durante 20 semanas en las condiciones anteriormente especificadas.

Transcurrido el período de crecimiento, se recogían diez plantas al azar para cada especie fúngica y dosis de inoculación, se limpiaba el sistema radical para liberarlo del sustrato de cultivo, y se tomaban los datos del diámetro y la altura del tallo, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte radical de cada una de las plantas. Los porcentajes de micorrización se determinaban por recuento directo, a la lupa binocular, de tres muestras tomadas al azar del sistema radical de cada planta. En cada muestra se contaban un total de 100 a 200 raíces cortas.

La significación de las diferencias entre tratamientos se determinaba por análisis de la varianza y se utilizaba el test de clasificación múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de las medias. Los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación angular de los datos ($\text{sen}^{-1} (\%/100)^{-2}$) antes de someterlos al análisis estadístico (Little y Hills, 1978; Snedecor y Cochran, 1980; Steel y Torrel, 1980).

Inoculaciones con esporas.

Preparación del inóculo.

Los esporocarpos de distintas las especies ectomicorrícicas (Tabla 3.2), recolectados en diferentes plantaciones forestales, se desecaban a 30-40 °C en una estufa con circulación forzada de aire durante 5-7 días. Una vez deshidratados, se conservaban en bolsas de herbario a temperatura ambiente hasta su utilización.

Tabla 3.2

Hongos ectomicorrícicos utilizados en las inoculaciones con esporas

Especie fúngica	Características de la zona de recolección			Especie ¹ vegetal asociada	Esporas/g de esporocarpo
	Localidad	Altitud	pH del suelo		
<i>Hymenogaster vulgaris</i> Tul.	Girona	1100	5.6	<i>P. men</i>	2.6 x 10 ⁹
<i>Melanogaster ambiguus</i>	Girona	1100	5.6	<i>P. men</i>	1.8 x 10 ⁹
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Girona	200	5.6	<i>Q. sub</i>	1.6 x 10 ⁹
<i>Rhizopogon roseolus</i> (a)	Tarragona	1000	7.2	<i>P. syl</i>	1.0 x 10 ¹⁰
<i>R. roseolus</i> (b)	Girona	100	5.6	<i>P. pin</i>	1.0 x 10 ¹⁰
<i>Rhizopogon subareolatus</i>	Girona	1100	5.6	<i>P. men</i>	1.0 x 10 ¹⁰
<i>Scleroderma citrinum</i>	La Coruña	300	4.3	<i>C. sat</i>	1.0 x 10 ⁹

¹ *C. sat* = *Castanea sativa*, *P. men* = *Pseudotsuga menziesii*, *P. pin* = *Pinus pinaster*, *P. syl* = *Pinus sylvestris*, *Q. sub* = *Quercus suber*.

Los inóculos de: *H. vulgaris*, *M. ambiguus*, *Rhizopogon* spp. y *S. citrinum*, se preparaban en forma de suspensión acuosa de esporas siguiendo la metodología descrita por Castellano y colaboradores (1985). Los esporocarpos deshidratados se maceraban en agua destilada durante 12 horas y se trituraban a alta velocidad en una batidora Waring^R, durante 2 min en un volumen de 200 ml de agua. La concentración de esporas de la suspensión madre se determinaba por recuento directo al microscopio en un hematocitómetro Newbauer y las distintas concentraciones de inóculo a utilizar se ajustaban por dilución en agua destilada a partir de la suspensión madre.

Las esporas de *P. tinctorius* se recogían en seco utilizando un tamiz de 0.5 mm de poro (Marx y Bryan, 1975). De la masa de esporas recogida, se tomaban 0.1 g, se suspendían en 50 ml de agua con cinco gotas de Tween 20 y se procedía a determinar la concentración de esporas por recuento directo al microscopio en un hematocitómetro Newbauer (Tabla 3.2.). El inóculo base se preparaba mezclando 4 g de esporas con 1100 cm³ de vermiculita grado 2, previamente humedecida al 20 % con agua destilada y esterilizada (120 °C, 15 min) (Marx, 1976). Las dosis de esporas a ensayar se preparaban por dilución seriada del inóculo base (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) en vermiculita humedecida estéril.

Selección de especies ectomicorrícicas para su aplicación en forma de esporas.

Se llenaban 192 contenedores con substrato de turba-vermiculita (1:1, v:v) estéril y se sembraban tres semillas, desinfectadas y estratificadas, por contenedor. Una vez germinadas, se dejaba una sola planta por contenedor y se mantenían en invernadero, bajo las condiciones de manejo ya especificadas, hasta su inoculación con las suspensiones de esporas.

Siguiendo la metodología descrita anteriormente, se preparaban 500 ml de una suspensión de basidiosporas, ajustada a 10^4 esporas/ml, para cada una de las especies: *H. vulgaris*, *M. ambiguus*, *R. roseolus* (a), *R. subareolatus* y *S. citrinum* (Tabla 3.2).

La inoculación de las plantas se llevaba a cabo a las 6 semanas de la siembra de las semillas, dispensando 10 ml de la suspensión de esporas por contenedor (10^5 esporas/planta). Se inoculaban 32 plantas para cada especie fúngica y se dejaban otras 32 plantas como controles sin inocular. Las plantas se distribuían al azar dentro del invernadero y se mantenían en las mismas condiciones de crecimiento durante cinco meses más.

Después de 24 semanas de crecimiento, se recogían las plantas, se limpiaba el sistema radical, y se tomaban los datos del diámetro y la altura del tallo, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte radical de cada una de ellas. Los porcentajes de micorrización se determinaban por recuento directo, a la lupa binocular, de tres muestras tomadas al azar del

sistema radical de cada planta, y en cada muestra se contaban un total de 100 a 200 raíces cortas.

La significación de las diferencias entre tratamientos se determinaba por análisis de la varianza y se utilizaba el test de clasificación múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de las medias.

Determinación de la dosis óptima de inóculo para las especies seleccionadas.

Seguendo las metodologías anteriormente descritas, se preparaban esporas de *P. tinctorius* mezcladas con vermiculita y suspensiones acuosas de esporas de las tres especies seleccionadas según los resultados del experimento anterior.

Las distintas concentraciones de esporas de *P. tinctorius* en vermiculita se mezclaban en la proporción 1:5 (inóculo:substrato, v:v) con substrato de turba-vermiculita (1:1, v:v) desinfectado, obteniéndose las dosis de inoculación de: 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 esporas/planta y 32 contenedores por dosis. Al mismo tiempo, se preparaban contenedores con substrato de turba-vermiculita (1:1, v:v) desinfectado. En todos los contenedores se sembraban tres semillas de *P. pinaster*, desinfectadas y estratificadas, y se distribuían totalmente al azar en el invernadero. Una vez germinadas, se dejaba una sola planta por contenedor y se hacían crecer en las condiciones experimentales anteriormente especificadas.

Las suspensiones de esporas en agua de *M. ambiguous* y *S. citrinum*, se ajustaban a las concentraciones necesarias para conseguir las dosis de inoculación por planta de: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 . Para *R. roseolus* (b) se utilizaban las concentraciones de 10^3 hasta 10^8 (Tabla 3.2). Seis semanas después de la siembra de las semillas, se inocularon 64 plantas por dosis para *M. ambiguous* y *R. roseolus*, y 32 plantas por dosis para *S. citrinum*.

Una vez transcurrido el período de crecimiento, se recogían diez plantas al azar de cada una de las dosis de inoculación y especie fúngica, se limpiaba el sistema radical para liberarlo del substrato de cultivo, y se tomaban los datos de diámetro y altura del tallo, peso seco de la parte aérea y peso seco de la parte radical de cada una de las plantas. Los porcentajes de micorrización se determinaban por recuento directo, a la lupa binocular,

de tres muestras tomadas al azar del sistema radical de cada planta. En cada muestra se contaban un total de 100 a 200 raíces cortas.

La significación de las diferencias entre tratamientos se determinaba por análisis de la varianza y se utilizaba el test de clasificación múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$) para la comparación de las medias. Los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación angular de los datos ($\text{sen}^{-1} (\%/100)^{-2}$) antes de someterlos al análisis estadístico (Little y Hills, 1978; Snedecor y Cochran, 1980; Steel y Torrel, 1980).

Resultados

Inóculo miceliar en turba vermiculita

Selección de cepas ectomicorrícicas para su aplicación en forma de inóculo miceliar en turba-vermiculita.

De la 19 cepas probadas, cuya capacidad simbiótica había sido demostrada en condiciones de síntesis en cultivo puro (Tabla 3.1), solamente seis formaron ectomicorrizas con *P. pinaster* en condiciones de invernadero, a pesar de las altas concentraciones de inóculo aplicadas en el substrato de crecimiento de las plantas (Tabla 3.3).

La inoculación con *H. crustuliniforme* S-66, *L. bicolor* S-238, *L. laccata* A-127, *L. decastes* A-71 y *P. tinctorius* A-93 producía la micorrización de más del 90 % de las plantas inoculadas. Los porcentajes más altos de micorrización, es decir, por encima del 75 % de raíces cortas micorrizadas por planta, se consiguieron con *H. crustuliniforme* S-66 y *P. tinctorius* A-93. (Lámina 3.1 *b* y *c*). El inóculo de *A. muscaria* A-17 producía un porcentaje de micorrización bajo (11 %), por lo que esta cepa no se incluyó en estudios posteriores.

En general, no se presentaban diferencias significativas entre los parámetros de crecimiento de las plantas no micorrizadas y las plantas micorrizadas. No obstante, las plantas micorrizadas con *P. tinctorius* presentaban un incremento significativo de su masa radical (Tabla 3.3). Las plantas que se mantuvieron en cultivo durante 5 meses o más (grupos 3, 4

y 5), tenían diámetros de tallo (2.4 a 3.7 mm) y alturas (22 a 32 cm) que se podían considerar adecuados para su trasplante a campo.

Dosis óptima de inóculo de las cepas seleccionadas.

Todas las plantas inoculadas con *H. crustuliniforme* S-66 resultaron micorrizadas a las dosis 1:4 y 1:8 (Inóculo:substrato, v:v). Los porcentajes medios de micorrización se hallaban entre el 67 % y el 81 % respectivamente, sin que estas diferencias fuesen significativas entre sí (Fig. 3.1). La reducción del inóculo a las dosis 1:16 y 1:32 producía una disminución en el número de plantas micorrizadas. A estas dosis, el porcentaje de micorrización era bajo y significativamente inferior a las anteriores. No se detectaron efectos significativos en el diámetro y la altura de las plantas entre las distintas dosis, aunque se produjo una disminución progresiva de la biomasa de las plantas al aumentar la dosis de inóculo (Tabla 3.4).

La inoculación con *L. bicolor* S-238 provocó la infección ectomicorrízica de todas las plantas, independientemente de la dosis de inóculo aplicada. Los niveles de micorrización no presentaban diferencias significativas entre las dosis 1:4 y 1:32, oscilando entre el 46 % y el 39 % respectivamente (Fig. 3.2). Aunque no se detectaron diferencias significativas en la biomasa, las plantas inoculadas con la dosis 1:32 presentaban diferencias significativas en altura respecto a las inoculadas con las dosis 1:4, 1:8 y 1:64 (Tabla 3.5).

La respuesta de las plantas a la inoculación con *L. laccata* A-127 era similar a la obtenida con *L. bicolor* S-238. Todas las plantas inoculadas se micorrizaron sin presentar diferencias significativas entre los porcentajes medios de micorrización en las distintas dosis utilizadas, variando desde un 48 % a un 58 % (Fig. 3.3). Las diferencias observadas en la altura y la biomasa de las plantas se relacionaban de forma inversa con la dosis de inóculo aplicada, siendo en las dosis 1:16 y 1:32 donde se presentaba el mejor crecimiento de las plantas (Tabla 3.6).

La inoculación con la cepa A-71 de *L. decastes*, utilizando las dosis entre 1:4 y 1:32, produjo un porcentaje comparable de plantas micorrizadas, sin que se presentaran diferencias significativas en los porcentajes medios de micorrización que oscilaban entre el 35 % y el 42 % (Fig. 3.4). Aunque no se detectaban diferencias en la biomasa, se presentaban diferencias

Tabla 3.3

Parámetros de crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculados con inóculo micelial de distintos hongos ectomicorrícicos a una dosis de 1:4 (Inóculo:substrato, v:v)

Grupo	Tiempo ¹ (m)	Hongos ²	Diámetro del tallo (mm)		Altura (cm)		Peso seco (mg)		Relación aérea/radical	x de plantas micorrizadas	Micorrización	
					aérea	radical	Total	aérea/radical			Raíces infectadas (%)	
1	4	Control	1.8 a	10.7 a	478 a	253 ab	733 a	2.0 ab	0	0		
		<i>Laccaria bicolor</i> S-238	1.8 a	10.8 a	413 a	185 a	594 a	2.2 bc	91	34		
		<i>Lyophyllum decastes</i> A-71	1.8 a	11.4 a	486 a	268 b	761 a	1.8 a	100	34		
		<i>Suillus bovinus</i> A-75	1.8 a	13.0 b	532 a	234 ab	764 a	2.4 c	0	0		
2	4.5	Control	2.0 ab	14.0 ab	681 ab	333 ab	1014 abc	2.1 a	0	0		
		<i>Amanita rubescens</i> A-77	2.2 b	16.1 ab	755 b	339 ab	1095 bc	2.2 a	0	0		
		<i>Hebeloma crustuliniforme</i> S-66	1.9 ab	15.6 bc	681 ab	325 ab	1006 abc	2.1 a	100	76		
		<i>Laccaria laccata</i> A-127	1.8 a	12.2 a	536 a	296 a	806 a	2.0 a	100	55		
		<i>Suillus granulatus</i> A-140	1.9 ab	16.6 ab	607 a	311 ab	918 ab	2.0 a	0	0		
		<i>Suillus variegatus</i> A-142	2.1 b	18.0 c	815 b	404 b	1219 c	2.1 a	0	0		
3	5	Control	2.5 ab	22.0 a	1413 a	671 ab	2080 ab	2.2 b	0	0		
		<i>Paxillus involutus</i> A-87	2.4 a	22.2 a	1334 a	524 a	1860 a	2.8 c	0	0		
		<i>Pisolithus tinctorius</i> A-93	2.7 b	25.4 a	1330 a	872 c	2144 ab	1.2 a	100	89		
		<i>Rhizopogon luteolus</i> A-5	2.5 ab	22.2 a	1358 a	664 ab	2026 ab	2.1 b	0	0		
		<i>Rhizopogon roseolus</i> A-96	2.6 ab	21.1 a	1398 a	704 ab	2094 ab	2.0 b	0	0		
		<i>Suillus luteus</i> A-33	2.7 b	24.2 a	1557 a	803 bc	2359 b	2.0 b	0	0		

Tabla 3.3 (Cont.)

Grupo	Tiempo ¹ (m)	Hongo ²	Diámetro del tallo (mm)		Altura (cm)		Peso seco (mg)		Micorrización								
							Parte aérea	Parte radical	Total	Relación aérea/radical	x de plantas micorrizadas	Raíces infectadas (%)					
4	8.5	Control	3.1	a	25.7	a	2208	ab	1847	a	4055	ab	1.3	a	0	0	
			Hebeloma														
			3.1	a	28.4	a	1963	a	1484	a	3447	a	1.3	a	0	0	0
			3.1	a	28.9	a	2414	b	1951	a	4365	b	1.4	ab	0	0	0
			3.2	a	29.4	a	2410	b	1513	a	3924	ab	1.8	b	0	0	0
5	9	Control	3.4	a	32.3	a	2583	a	1652	a	4233	a	1.6	b	4	1	
			3.5	ab	29.6	a	2764	a	2231	a	5003	b	1.3	a	0	0	
			3.7	b	31.2	a	2610	a	1754	a	4370	a	1.5	b	75	11	
			Amanita aspera A-48														
			Amanita muscaria A-17														

1 Tiempo de crecimiento de las plantas en meses, desde la siembra de la semilla en el sustrato inoculado hasta la recolección de las plantas para la toma de datos.

2 En las Tablas 2.2 y 2.5, del capítulo "Hongos ectomicorrizales de *P. pinaster* en el norte de España", se detallan las características y el potencial micorrizal en condiciones de síntesis axénica para cada una de las cepas fúngicas utilizadas en estos experimentos.

Dentro de cada uno de los grupos, las medias que comparten una misma letra no eran significativamente distintas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$

Tabla 3.4

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de inóculo micelilar de *H. crustuliniforme* S-66 en turba-vermiculita.

Dosis de Inóculo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
1:4	1.9 a	14.8 a	609 a	282 a	891 a	2.1 a	100
1:8	1.9 a	15.4 a	661 ab	342 a	1004 ab	1.9 a	100
1:16	2.0 a	17.1 a	733 ab	366 ab	1099 ab	2.0 a	70
1:32	2.0 a	17.4 a	769 b	441 b	1211 b	2.1 a	50

1 Inóculo : substrato, (v/v).

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

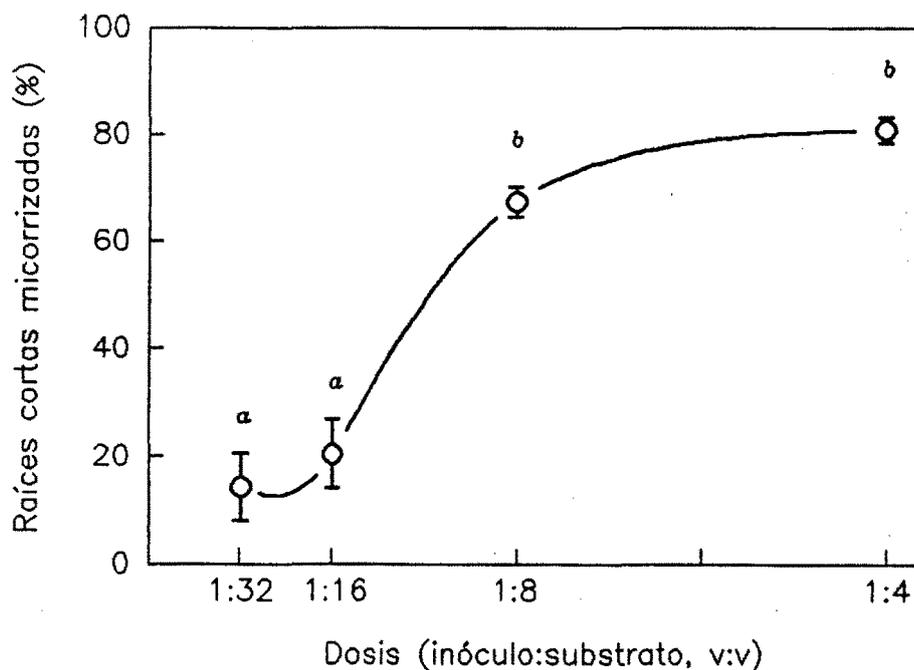


Fig 3.1. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor, inoculados con distintas dosis de inóculo micelilar en turba-vermiculita de *H. crustuliniforme* S-66. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias seguidas de una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.5

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de inóculo micelial de *L. bicolor* S-238 en turba-vermiculita.

Dosis de inóculo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
1:4	2.3 a	24.3 a	922 a	369 a	1291 a	2.6 ab	100
1:8	2.1 a	24.6 a	886 a	425 a	1311 a	2.1 ab	100
1:16	2.1 a	26.2 ab	814 a	462 a	1276 a	1.8 a	100
1:32	2.3 a	28.6 b	931 a	353 a	1284 a	2.7 b	100
1:64	2.3 a	24.5 a	939 a	368 a	1307 a	2.6 ab	100

1. Inóculo : substrato (v/v).

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

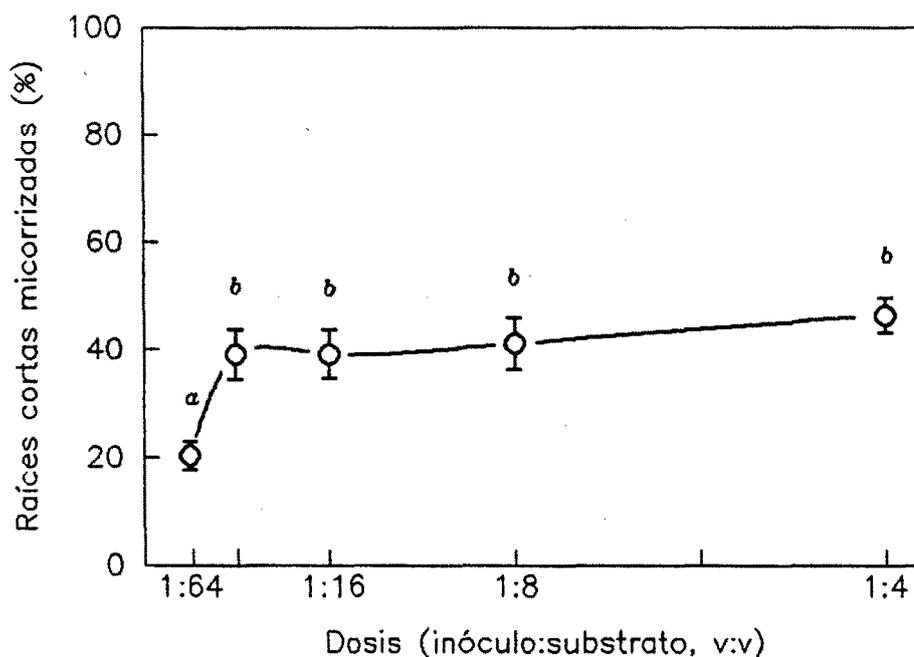


Fig 3.2. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de inóculo micelial en turba-vermiculita de *L. bicolor* S-238. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.6

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de inóculo micelial de *L. laccata* A-127 en turba-vermiculita.

Dosis de inóculo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
1:4	1.8 a	12.6 a	512 a	243 a	755 a	2.1 a	100
1:8	1.8 a	12.2 a	545 ab	296 ab	841 ab	1.9 a	100
1:16	1.8 a	14.1 ab	632 bc	310 ab	954 b	2.0 a	100
1:32	1.9 a	15.6 b	648 c	322 b	959 b	2.1 a	100

1 Inóculo : sustrato (v/v).

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

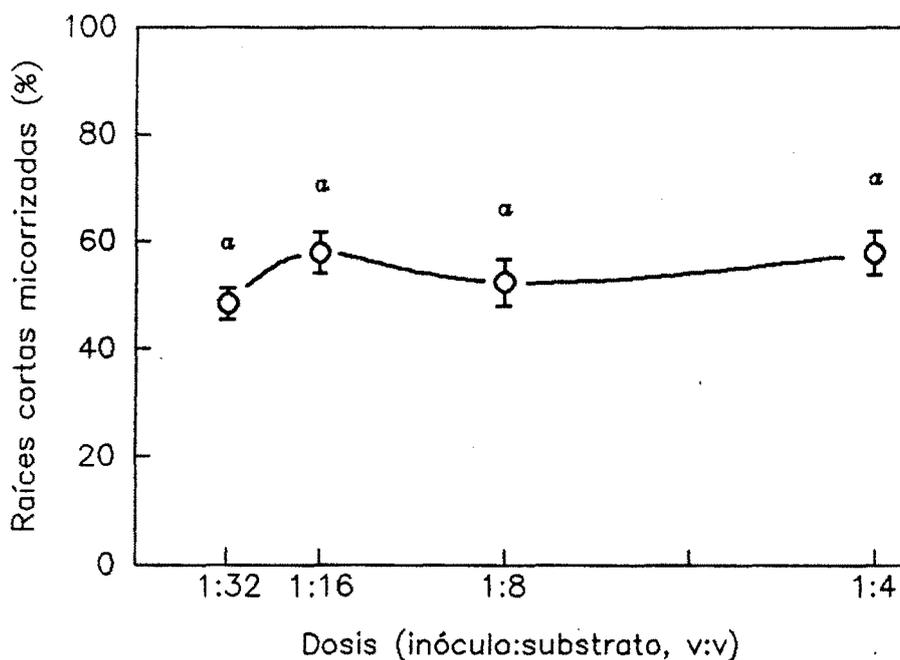


Fig 3.3. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculados con distintas dosis de inóculo micelial en turba-vermiculita de *L. laccata* A-127. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

significativas entre la altura de las plantas inoculadas con las dosis medias (1:8, 1:16 y 1:32) y las inoculadas con las dosis extremas (1:4 y 1:64) (Tabla 3.7).

La inoculación con *P. tinctorius* A-93, a las dosis 1:4, 1:8 y 1:16, produjo porcentajes medios de micorrización que oscilaban entre el 83 % y el 66 %, sin que se detectaran diferencias significativas entre sí. No obstante, el porcentaje de plantas micorrizadas descendía al reducir la dosis de inoculación. Las dosis inferiores (1:32 y 1:64) provocaron un porcentaje de micorrización bajo (< 40 %) (Fig. 3.5). No se detectaron diferencias significativas en la biomasa total de las plantas, aunque las dosis 1:8 y 1:16 tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento en altura respecto al resto de tratamientos (Tabla 3.8).

Inóculo micelial incluido en alginato polimerizado.

Todas las plantas inoculadas con *L. bicolor* S-238 a densidades de micelio comprendidas entre 1.00 y 0.12 g (peso seco) por litro de alginato (g/l) se micorrizaron sin que se produjeran diferencias significativas en el porcentaje medio de micorrización, que oscilaba entre el 33 % y el 24 %. Al aumentar la concentración de micelio a 2.00 g/l se redujo el número de plantas infectadas y el porcentaje de micorrización (Fig. 3.6). No se detectaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento de las plantas inoculadas con las distintas dosis de micelio (Tabla 3.9). Cuando la dosificación del hongo se efectuó variando el volumen de inóculo de alginato incorporado al sustrato de crecimiento y preparado a una densidad de micelio de 1 g/l, solo se produjo una disminución significativa del porcentaje de micorrización a la dosis más baja (1:64, inóculo:sustrato, v:v) (Fig. 3.7). El número de plantas micorrizadas disminuyó con la dosis de inóculo y la biomasa de las plantas con menor porcentaje de micorrización era superior al resto de tratamientos (Tabla 3.10).

La efectividad del inóculo de *L. decastes* A-71 en alginato polimerizado resultó prácticamente restringida a una única concentración de micelio, 0.5 g/l (Fig. 3.8). Esta dosis produjo el mayor número de plantas micorrizadas y un porcentaje de micorrización (38 %) significativamente superior al resto

Tabla 3.7

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de Inóculo micelial de *L. decastes* A-71 en turba-vermiculita.

Dosis de inóculo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
1:4	2.1 a	22.7 a	902 a	384 a	1286 a	2.3 a	86
1:8	2.3 a	29.0 b	940 a	363 a	1304 a	2.6 a	85
1:16	2.2 a	29.1 b	916 a	363 a	1279 a	2.6 a	84
1:32	2.3 a	27.4 b	981 a	308 a	1290 a	3.0 a	88
1:64	2.3 a	23.7 a	855 a	350 a	1205 a	2.5 a	71

1 Inóculo : sustrato (v/v).

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, ($n = 10$).

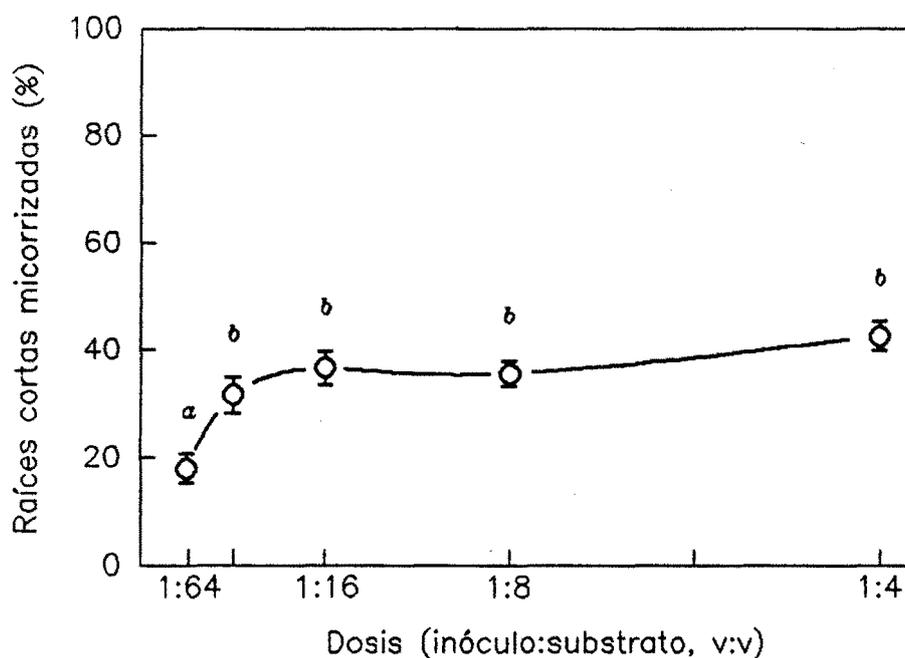


Fig 3.4. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de inóculo micelial en turba-vermiculita de *L. decastes* A-71. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ ($n = 10$).

Tabla 3.8

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de Inóculo micelial de *P. tinctorius* A-93 en turba-vermiculita.

Dosis de inóculo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
1:4	2.2 a	24.5 b	939 a	489 a	1428 a	2.0 ab	100
1:8	2.2 a	29.9 c	977 a	473 a	1451 a	2.2 b	80
1:16	2.3 a	28.6 c	916 a	396 a	1312 a	2.4 b	59
1:32	2.3 a	19.3 a	813 a	521 a	1334 a	1.6 a	40
1:64	2.3 a	19.3 a	793 a	480 a	1273 a	1.7 a	24

1 Inóculo : substrato (v/v).

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

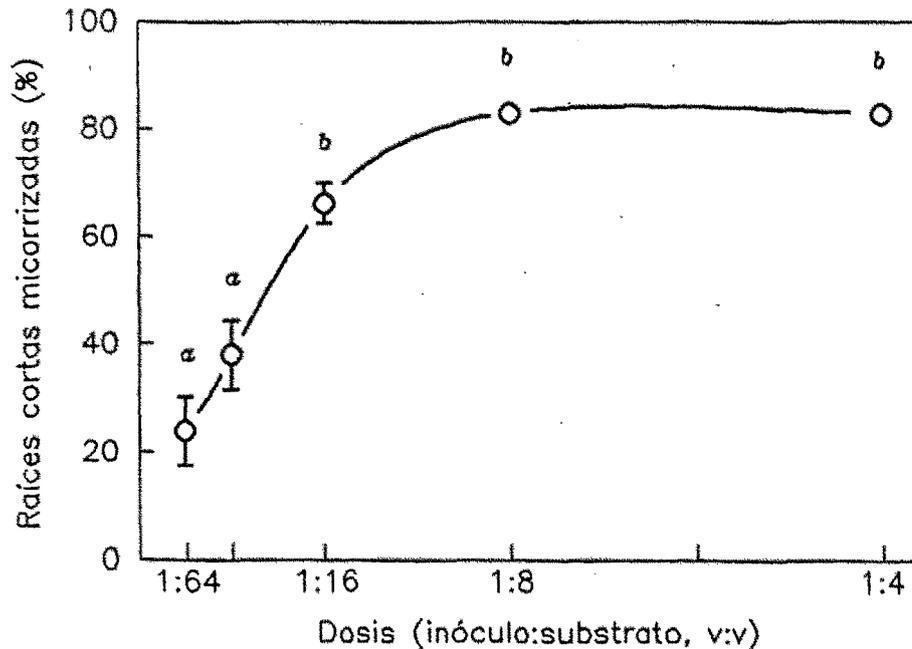


Fig 3.5. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculados con distintas dosis de inóculo micelial en turba-vermiculita de *P. tinctorius* A-93. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.9

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas dosis de inóculo micellar de *L. bicolor* S-238 atrapado en gel de alginato de sodio.

Dosis de Inóculo (g/l) ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz (%)	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
2.00	2.3 a	24.0 a	974 a	698 a	1672 b	1.5 a	70
1.00	2.0 a	23.5 a	787 a	408 a	1195 a	2.1 a	100
0.50	2.2 a	25.8 a	857 a	416 a	1273 ab	2.1 a	100
0.25	2.2 a	24.9 a	809 a	445 a	1254 ab	2.1 a	100
0.12	2.4 a	24.8 a	901 a	443 a	1344 ab	2.3 a	100

1 (g/l) = gramos de micelio (peso seco) / litro de alginato. Todos los tratamientos recibieron el mismo volumen de bolas de alginato (1:13, inóculo:substrato, v:v), la dosificación se estableció variando la concentración de micelio fúngico por litro de alginato.

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

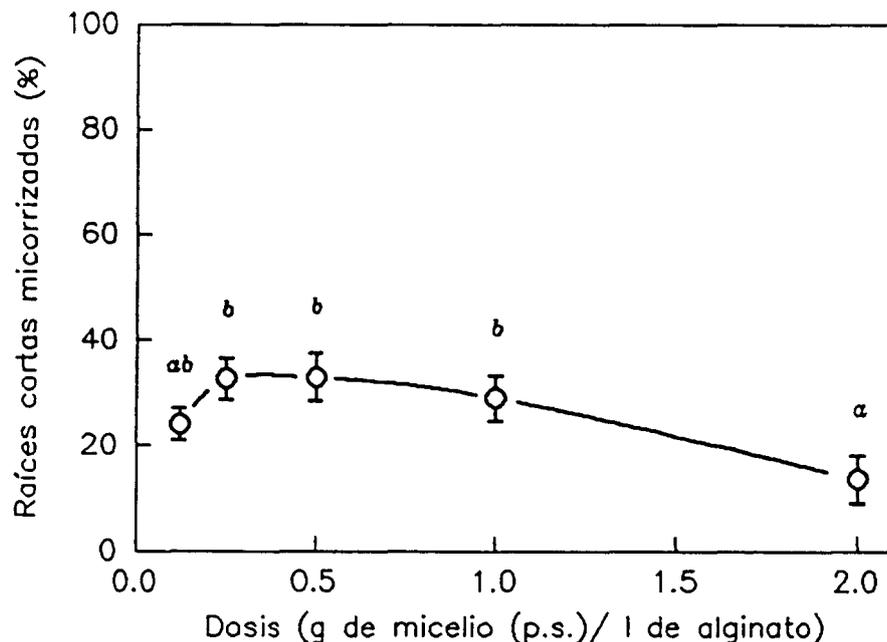


Fig 3.6. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor, inoculados con distintas concentraciones de micelio de *L. bicolor* S-238 atrapado en gel de alginato de sodio. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.10

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas proporciones de inóculo micelario de *L. bicolor* S-238 atrapado en gel de alginato de sodio.

Dosis de inóculo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
1:2	2.0 a	21.4 a	713 a	327 a	1040 a	2.2 a	100
1:4	2.0 a	20.8 a	719 a	306 a	1025 a	2.4 a	100
1:8	1.8 a	20.0 a	669 a	284 a	953 a	2.4 a	100
1:16	1.9 a	20.1 a	623 a	269 a	892 a	2.4 a	100
1:32	1.9 a	20.3 a	723 a	315 a	1038 a	2.3 a	80
1:64	2.0 a	17.6 a	907 b	422 b	1329 b	2.2 a	40

1 Inóculo : substrato, (v:v). La concentración de micelio atrapado por unidad de volumen de alginato era constante en todos los tratamientos (1 g de micelio (peso seco)/ 1 de alginato), la dosificación se estableció variando la cantidad de alginato por unidad de volumen del substrato inoculado.

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

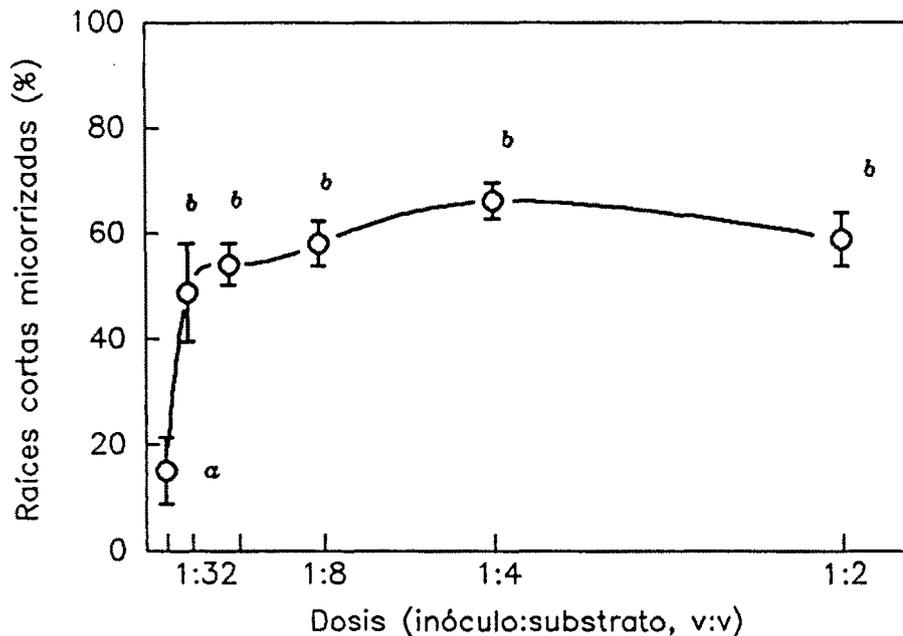


Fig 3.7. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de gel de alginato de sodio que contenía micelio de *L. bicolor* S-238. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.11

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor Inoculado con distintas dosis de inóculo micelar de *L. decastes* A-71 atrapado en gel de alginato de sodio.

Dosis de inóculo ¹ (g/l)	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
2.00	2.1 ab	20.2 a	805 a	364 a	1170 a	2.2 a	4
1.00	1.8 a	23.4 a	736 a	436 a	1172 a	1.8 a	15
0.50	2.1 ab	23.9 a	852 a	401 a	1253 a	2.3 a	50
0.25	2.1 ab	23.8 a	899 a	422 a	1321 a	2.3 a	8
0.12	2.3 b	23.3 a	912 a	440 a	1353 a	2.1 a	4

1 (g/l) = gramos de micelio (peso seco) / litro de alginato. Todos los tratamientos recibieron el mismo volumen de alginato (1:13, inóculo:substrato, v:v), la dosificación se estableció variando la concentración de micelio fúngico por litro de alginato.

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, ($n = 10$).

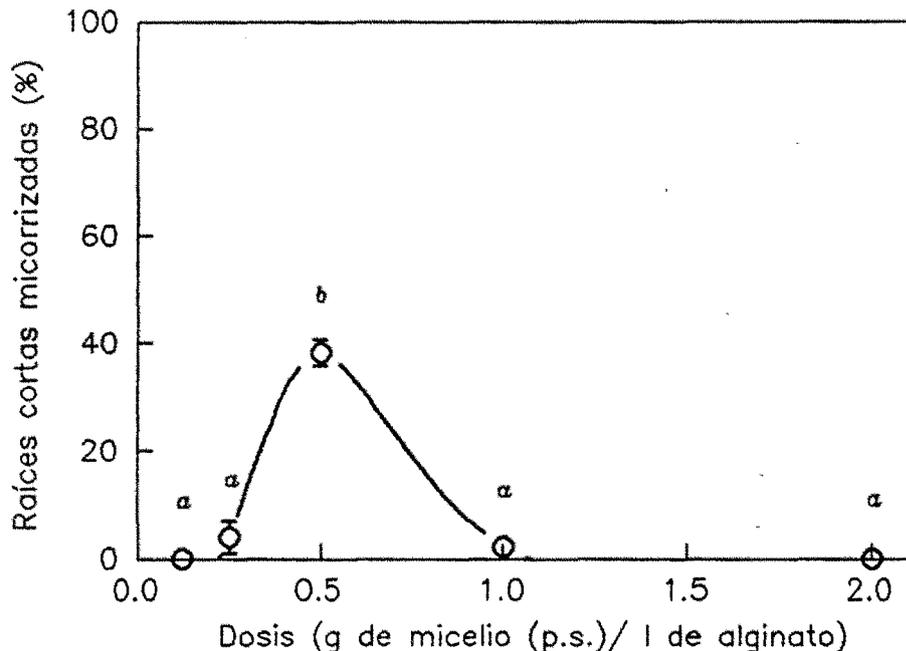


Fig 3.8. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculados con distintas concentraciones de micelio de *L. decastes* A-71 atrapado en gel de alginato de sodio. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ ($n = 10$).

de las dosis. No obstante, no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo vegetativo de las plantas (Tabla 3.11).

Con este método de inoculación, ninguna de las dosis probadas con *P. tinctorius* y *R. roseolus* resultó efectiva para la micorrización de *P. pinaster* en contenedor.

Inóculo preparado con esporas.

Selección de especies ectomicorrícicas para su aplicación en forma de esporas.

La inoculación con suspensiones de esporas de: *H. vulgaris*, *M. ambiguus*, *R. roseolus* y *S. citrinum*, resultó efectiva para la micorrización de *P. pinaster* en contenedor (Lámina 3.1 *d, e y f*). Las ectomicorrizas formadas por *H. vulgaris* mostraban, en general, una morfología dicótoma o doblemente bifurcada. Presentaban un manto fúngico delgado, liso o ligeramente aterciopelado, con un aspecto superficial hirsuto a causa de la presencia de numerosas espículas (Lámina 3.1 *a*). No se detectaba la existencia de micelio extramatricial ni la formación de cordones o rizomorfias. La red de Hartig penetraba hasta la segunda capa de células corticales¹. Todas las plantas, independientemente del tratamiento de inoculación, presentaban un desarrollo vegetativo que satisfacía los parámetros de calidad para una planta de reforestación. Solamente se detectaron diferencias significativas en la biomasa total las plantas inoculadas con *R. roseolus* (Tabla 3.12).

Dosis óptima de inoculación.

La inoculación con distintas concentraciones de esporas de *M. ambiguus* produjo la máxima micorrización a las dosis de 10^6 y 10^7 esporas/planta, con porcentajes medios de micorrización del 83 % y el 87 % respectivamente (Fig. 3.9). Tanto el porcentaje medio de micorrización como el número de plantas infectadas descendían al disminuir la dosis de inóculo. El diámetro, la altura

¹

La morfología del resto de especies ectomicorrícicas fue idéntica a la descrita en el capítulo 2 : "Hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* en el norte de España".

y la biomasa total de las plantas no presentaban diferencias significativas entre los distintos niveles de inoculación (Tabla 3.13).

La incorporación, al substrato de cultivo, de una mezcla de vermiculita con distintas cantidades de esporas de *P. tinctorius*, produjo la micorrización máxima al aplicar la dosis de 10^6 esporas por planta. A esta dosis, el porcentaje medio de micorrización fue del 66 % y no presentaba diferencias significativas con las dosis inmediatamente inferior y superior. Al aumentar la dosis de inóculo a 10^8 esporas/planta, se produjo una disminución significativa del porcentaje de micorrización (Fig. 3.10). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de: altura de las plantas, peso seco de la raíz y relación de la parte aérea y radical entre los distintos tratamientos (Tabla 3.14), aunque no se pudo establecer una correspondencia entre estas diferencias y el estado micorrízico de las plantas.

La inoculación con basidiosporas de *R. roseolus* produjo la micorrización de prácticamente todas las plantas inoculadas. Los porcentajes medios de micorrización aumentaron proporcionalmente con las dosis aplicadas, sin presentar diferencias significativas entre las dosis 10^5 a 10^8 , que oscilaron entre el 53 % y el 67 %. No obstante, la dosis más alta produjo una ligera disminución en la formación de ectomicorrizas (Fig. 3.11). Los distintos niveles de micorrización no afectaron al crecimiento en diámetro ni a la biomasa de las plantas. Aunque se detectaron diferencias significativas en la altura y la relación de las partes aérea y radical de las plantas inoculadas con las dosis mínima y máxima (Tabla 3.15).

La inoculación con esporas de *S. citrinum* produjo la micorrización máxima entre las dosis de 10^5 y 10^7 esporas/planta. Al disminuir la concentración de esporas, disminuyó el número de plantas infectadas y el porcentaje medio de micorrización (Tabla 3.16, Fig. 3.12). Los porcentajes de micorrización en las tres dosis más altas, oscilaron entre el 84 % y el 92 % y solamente se detectaron diferencias significativas en el crecimiento en altura entre las plantas inoculadas con la dosis 10^7 y las inoculadas con las dosis 10^6 y 10^5 (Tabla 3.16). El hongo llegó a fructificar en algunas de las plantas que presentaban los niveles de micorrización más altos (Lámina 3.1 f).

Tabla 3.12

Crecimiento y estado ectomicorrizico de *P. pinaster* en contenedor inoculados con suspensiones de basidiosporas de distintos hongos ectomicorrizicos

Hongo ¹	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación aérea/radical	x de plantas micorrizadas	Micorrización	
			Parte aérea	Parte radical	Total			% de plantas micorrizadas	Raíces infectadas (%)
Control	2.9 a	35.7 a	1958 a	1653 a	3611 a	1.3 a	0	0	0
<i>Hymenogaster vulgaris</i>	3.4 a	30.8 a	2458 a	1613 a	4071 a	1.6 a	93	30	30
<i>Melanogaster ambiguus</i>	2.8 a	37.4 a	2269 a	1382 a	3651 a	1.6 a	55	48	48
<i>Rhizopogon roseolus</i>	3.4 a	30.1 a	3286 b	3286 b	5456 b	1.5 a	89	36	36
<i>Rhizopogon subareolatus</i>	3.3 a	30.6 a	2577 a	1558 a	4136 a	1.7 a	0	0	0
<i>Scleroderma citrinum</i>	2.9 a	35.6 a	2095 a	1257 a	3352 a	1.7 a	90	65	65

1 Todos los hongos se inocularon a la dosis de 10⁵ esporas/planta aplicada seis semanas después de la siembra de las semillas.

Dentro de una misma columna, las medias que comparten una misma letra no son significativamente distintas según el test de comparación múltiple de Tukey para P ≤ 0.05.

Tabla 3.13

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de basidiosporas de *M. ambiguus*.

Dosis de inóculo ¹ (sp/pl)	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
10 ³	2.0 a	22.9 a	921 a	628 ab	1550 a	1.5 ab	27
10 ⁴	2.0 a	24.1 a	863 a	588 ab	1451 a	1.6 ab	91
10 ⁵	2.0 a	24.2 a	812 a	488 ab	1300 a	1.8 b	87
10 ⁶	2.1 a	24.3 a	852 a	731 b	1583 a	1.2 a	89
10 ⁷	2.1 a	24.6 a	807 a	446 a	1253 a	1.8 b	95

1 (sp/pl) = concentración de esporas por planta en un contenedor de 175 cm³ de volumen.

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

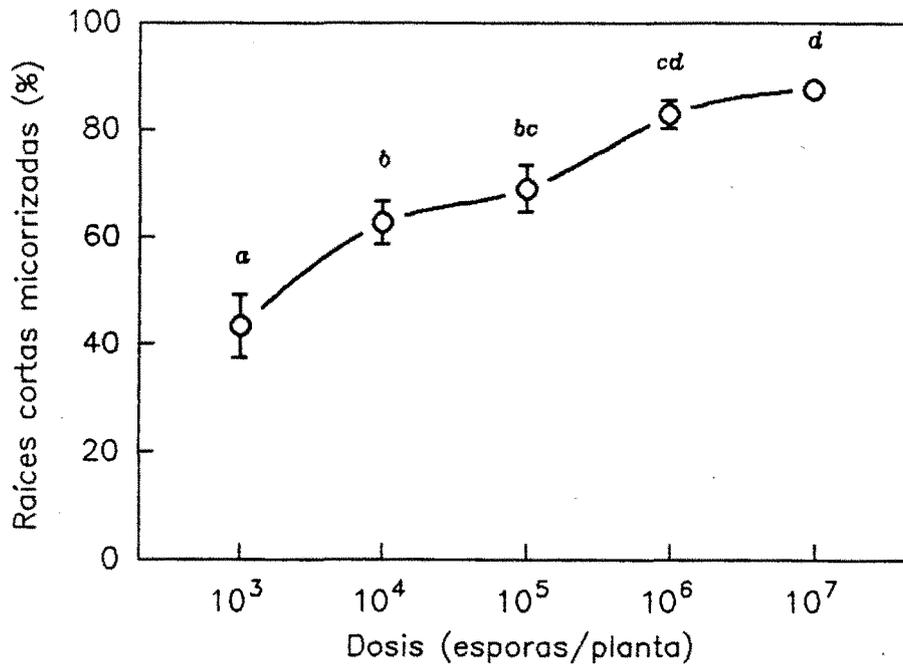


Fig 3.9. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de esporas de *M. ambiguus*. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.14

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de basidiosporas de *P. tinctorius*.

Dosis de inóculo ¹ (sp/pl)	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
10 ⁴	2.2 a	21.4 ab	909 a	422 ab	1331 a	2.2 ab	96
10 ⁵	2.0 a	23.0 b	796 a	532 b	1328 a	1.5 a	100
10 ⁶	2.0 a	22.6 ab	767 a	392 ab	1160 a	2.0 ab	100
10 ⁷	1.9 a	23.6 b	806 a	349 a	1156 a	2.4 b	96
10 ⁸	1.9 a	20.0 a	793 a	343 a	1137 a	2.3 b	96

1 (sp/pl) = concentración de esporas por planta en un contenedor de 175 cm³ de volumen de sustrato.

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

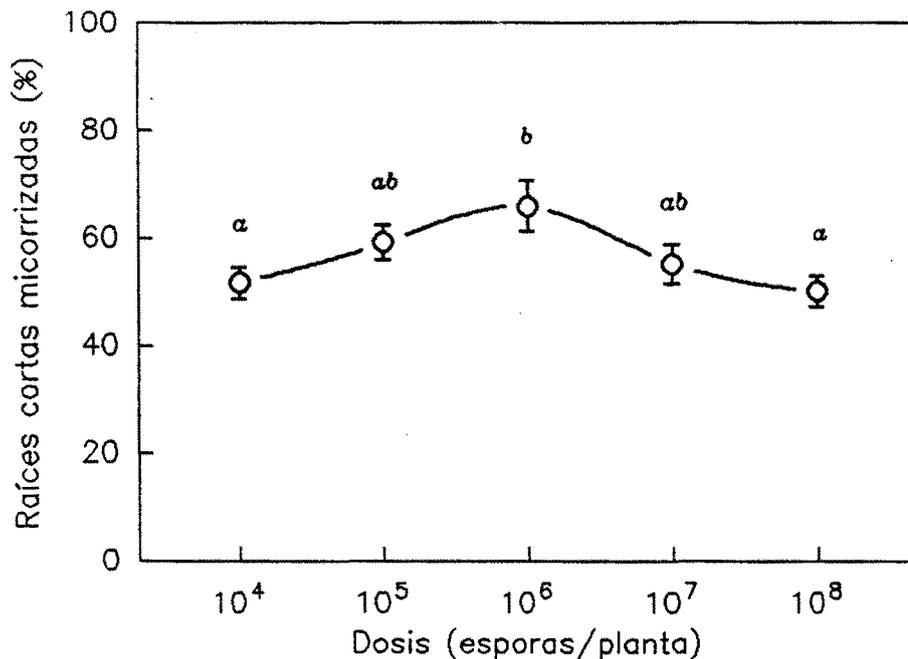


Fig 3.10. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de esporas de *P. tinctorius*. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.15

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de basidiósporas de *R. roseolus*.

Dosis de inóculo ¹ (sp/pl)	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
10 ³	2.0 a	21.2 a	807 a	427 a	1234 a	1.9 a	90
10 ⁴	2.2 a	25.1 b	962 a	406 a	1368 a	2.4 ab	100
10 ⁵	2.2 a	23.8 ab	942 a	420 a	1362 a	2.3 ab	96
10 ⁶	2.1 a	24.4 b	952 a	365 a	1218 a	2.3 ab	100
10 ⁷	2.1 a	23.2 ab	855 a	434 a	1289 a	2.1 ab	100
10 ⁸	2.2 a	24.3 b	870 a	332 a	1203 a	2.7 b	100

1 (sp/pl) = concentración de esporas por planta en un contenedor de 175 cm³ de volumen de sustrato.

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, (n = 10).

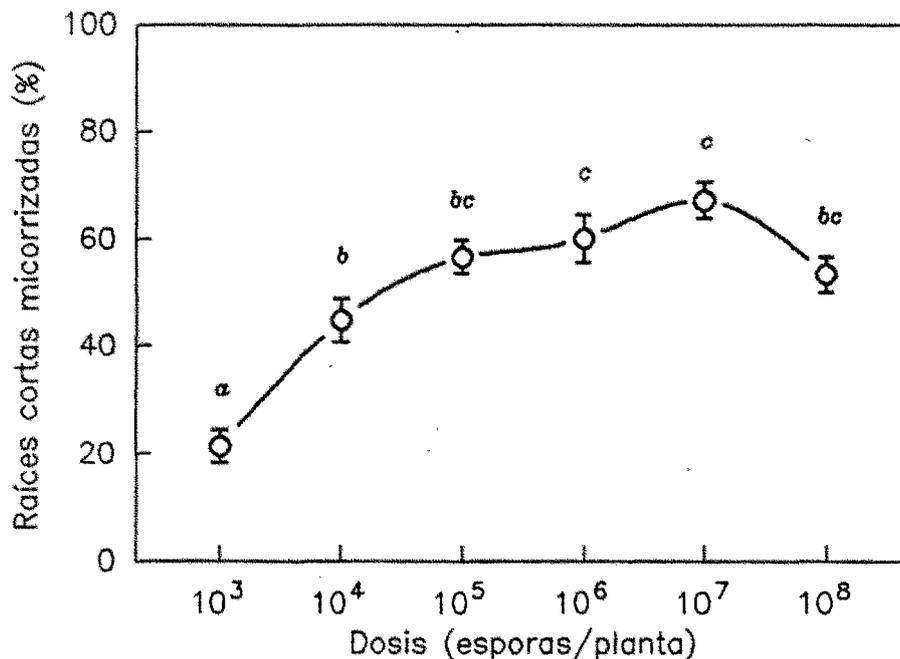


Fig 3.11. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculados con distintas concentraciones de esporas de *R. roseolus*. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ (n = 10).

Tabla 3.16

Crecimiento y micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculado con distintas concentraciones de basidiosporas de *S. citrinum*.

Dosis de Inóculo ¹ (sp/pl)	Diámetro del tallo (mm)	Altura (cm)	Peso seco (mg)			Relación parte aérea/raíz (%)	Plantas micorr. ² (%)
			Parte aérea	Parte radical	Total		
10 ³	2.9 a	27.7 ab	2128 a	1830 a	3959 a	1.3 a	37
10 ⁴	2.8 a	25.4 ab	2052 a	1691 a	3744 a	1.3 a	87
10 ⁵	2.6 a	31.7 b	2076 a	1608 a	3691 a	1.5 a	100
10 ⁶	2.7 a	31.2 b	2035 a	1447 a	3483 a	1.8 a	100
10 ⁷	2.8 a	24.7 a	1930 a	1036 a	2966 a	1.9 a	100

1 (sp/pl) = concentración de esporas por planta en un contenedor de 175 cm³ de volumen

2 Porcentaje de plantas micorrizadas por el hongo inoculado respecto al total de plantas inoculadas.

Dentro de una misma columna, las medias seguidas de una misma letra no presentan diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$, ($n = 10$).

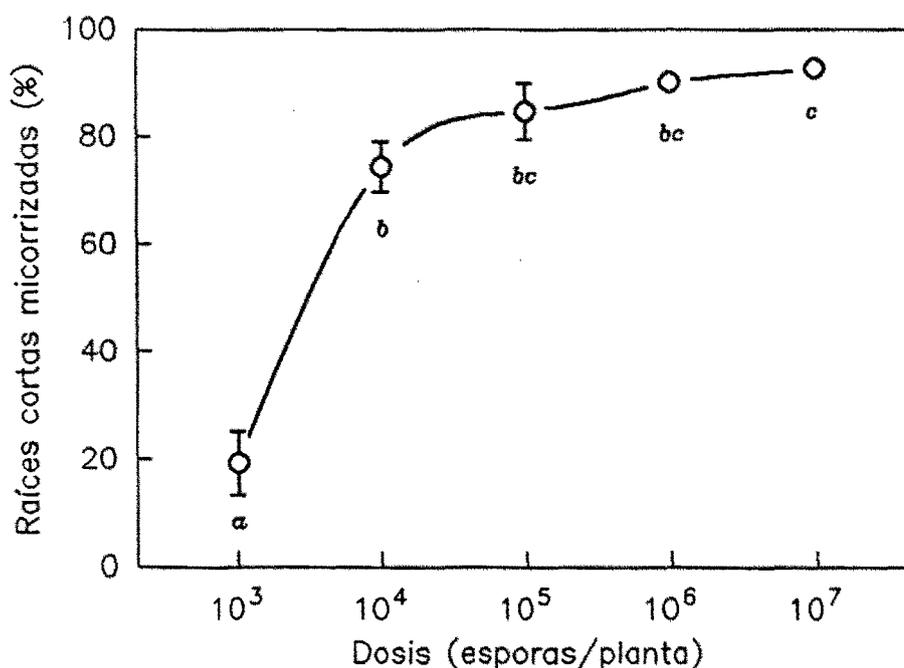


Fig 3.12. Porcentajes medios de micorrización de *P. pinaster* en contenedor inoculados con distintas concentraciones de esporas de *S. citrinum*. Las barras verticales representan el error estándar interno. Las medias que comparten una misma letra no presentaban diferencias significativas según el test de comparación múltiple de Tukey para $P \leq 0.05$ ($n = 10$).

Discusión

La efectividad de la inoculación en condiciones de vivero no depende únicamente de la capacidad simbiótica del hongo ectomicorrícico seleccionado, sino que también juegan un papel importante la calidad y la viabilidad del inóculo producido, así como su capacidad para sobrevivir entre la inoculación del sustrato y la formación de micorrizas. El inóculo de un hongo micorrícico, aun siendo capaz de formar ectomicorrizas en condiciones axénicas, puede fallar totalmente al ser aplicado en vivero (Molina, 1980; Shaw *et al.*, 1982; Danielson *et al.*, 1984b).

Ninguna de las especies de *Rhizopogon* y *Suillus*, todas ellas capaces de formar altos porcentajes de micorrización con *P. pinaster* en condiciones de síntesis en cultivo puro (Tabla 2.5), lograron infectar las plantas crecidas en contenedor al ser inoculados en el sustrato utilizando inóculos miceliares producidos en turba-vermiculita (Tabla 3.3). Los resultados obtenidos por otros investigadores son contradictorios. La inoculación con distintas especies de estos géneros ha sido efectiva en *P. radiata* (Theodorou y Bowen, 1970) y *P. caribaea* a raíz desnuda (Vozzo y HacsKaylo, 1971), así como en *Quercus* spp. en contenedor (Dixon *et al.*, 1984), pero inefectiva en la inoculación de distintas coníferas en contenedor (Molina, 1980; Garbaye y Bowen, 1987). Se ha sugerido que la falta de efectividad del inóculo micellar de *Rhizopogon* y *Suillus* podría estar relacionado con una elevada sensibilidad de estos hongos a la manipulación durante la producción y aplicación de este tipo de inóculo, así como a la baja capacidad de estas especies para sobrevivir en forma saprofitica hasta la formación de las primeras raíces susceptibles de ser infectadas (Molina, 1980).

La escasa o nula efectividad de los inóculos miceliares de *S. citrinum* y las tres especies de *Amanita* estudiadas (Tabla 3.3) puede estar relacionada con su lento crecimiento en los medios de cultivo utilizados. Aunque los inóculos preparados presentaban un crecimiento micellar adecuado, los períodos de incubación eran demasiado largos, por lo que el estado fisiológico del micelio podría ser inadecuado para iniciar la infección de las raíces.

Las cepas de *H. cylindrosporum* y *P. involutus* utilizadas en este trabajo no resultaron efectivas en la micorrización de *P. pinaster* en contenedor, a

pesar de que ambas formaron un alto porcentaje de micorrización en condiciones de síntesis en cultivo puro (Tabla 2.5). No obstante, otras cepas de estas especies han sido utilizadas con éxito para la micorrización de *P. pinaster* (Delmas *et al.*, 1978; Branzanti y Zambonelli, 1987). Se ha demostrado que tanto la capacidad de infección del sistema radical, como el efecto que pueda producir sobre la planta, varían entre cepas de una misma especie micorrícica (Laiho, 1970; Graham y Linderman, 1981; Marx, 1981; Le Tacon y Bouchard, 1986; Malajczuk *et al.*, 1990).

Hebeloma crustuliniforme S-66 y *P. tinctorius* A-93 muestran un comportamiento muy similar en cuanto a la efectividad en la formación de micorrizas mediante la aplicación de inóculo producido en turba-vermiculita (Tabla 3.3, Fig 3.1 y 3.5). Ambas cepas producen porcentajes altos de micorrización si se utilizan a dosis elevadas de inóculo, pero la efectividad baja rápidamente al disminuir la dosis de aplicación.

Laccaria bicolor S-238, *L. laccata* A-127 y *L. decastes* A-71 presentan también un comportamiento similar entre si en cuanto a la relación dosis-micorrización. El grado de colonización del sistema radical de *P. pinaster* es intermedio para las tres cepas, pero el inóculo se mantiene en el mismo nivel de efectividad aunque la dosis de aplicación se reduzca hasta ocho veces (Fig 3.2, 3.3 y 3.4).

El nivel mínimo de micorrización, necesario para que el efecto del hongo introducido en el vivero siga manteniéndose tras el trasplante a campo, ha sido estudiado para muy pocas especies ectomicorrícicas. Para *P. tinctorius* se ha establecido que la micorrización resulta efectiva si las plantas del vivero presentan al menos un 50 % de las raíces cortas infectadas por el hongo introducido (Marx, 1980; Ruehle *et al.*, 1981 b). Para otras especies (*A. muscaria*, *Lactarius rufus*, *Tricholoma albobruneum*) se han conseguido buenos resultados con porcentajes de micorrización inicial inferiores (Stenström y Ek, 1990). No obstante, la presencia de un mínimo del 50 % de raíces infectadas se ha tomado como un buen indicador para asegurar la efectividad de la inoculación en vivero (Last *et al.*, 1990; Trofymov, 1990).

La inoculación de *P. pinaster* con inóculo micelilar de *L. bicolor* S-238 atrapado en alginato, daba mejores resultados si la concentración de micelio se mantenía entre 0.25 y 1.00 g de micelio / l de alginato (19 - 75 mg de

micelio / l de substrato). Aumentar la concentración de micelio hasta 2.00 g/l de alginato, producía una disminución en el número de plantas infectadas (Tabla 3.9) y el porcentaje de micorrización (Fig 3.6). Este efecto era más evidente en el caso de *L. decastes*, donde la aplicación de un inóculo que contenía 0.50 g de micelio / l de alginato producía porcentajes de micorrización netamente superiores al resto de las dosis (Fig 3.8). En ambos casos, la concentración de micelio por unidad de volumen de alginato influía directamente en el porcentaje de micorrización obtenido. El micelio incluido en alginato debe crecer, desde el interior del polímero y a través del substrato, hasta infectar las raíces de la planta. Para este crecimiento, el hongo requiere un aporte de carbono y energía que deberá obtener de los nutrientes disponibles en el medio. Cuanto mayor sea la cantidad de micelio incorporada por unidad de volumen de alginato, mayor será el número de puntos de crecimiento micellar activo, y por tanto, aumentará la demanda de nutrientes. Se puede especular que una concentración inicial de micelio demasiado alta puede desenvocar en un crecimiento posterior reducido, debido al rápido agotamiento de los nutrientes en la zona donde se localiza el inóculo. Por otro lado, si la cantidad de micelio incorporado por unidad de volumen de alginato es baja, el número de puntos de crecimiento es también bajo, y aunque cada uno de ellos pueda desarrollar un crecimiento vegetativo normal, la biomasa fúngica resultante será menor. En ambos casos, disminuirá la probabilidad de que estas hifas alcancen una raíz susceptible de ser micorrizada. Si esta hipótesis es cierta, explicaría la existencia de una dosis óptima de concentración micellar, que variaría según las características metabólicas y fisiológicas de cada especie.

Una vez establecida una concentración adecuada de micelio de *L. bicolor* S-238 atrapado en alginato polimerizado, se puede reducir la aplicación de inóculo hasta 1:32 (Inóculo:substrato, v:v), o lo que es lo mismo 0.03 g de micelio (peso seco) por litro de substrato, sin que se detecten diferencias significativas en el porcentaje de micorrización de las plantas (Fig 3.7). No obstante, para asegurar la micorrización de todas las plantas inoculadas, la aplicación del inóculo debía hacerse a una proporción 1:16 (inóculo: substrato, v:v) (Tabla 3.10).

En comparación con el inóculo miceliar en turba-vermiculita, la encapsulación de micelio en alginato polimerizado permite una rápida y fácil producción de inóculo, y se han obtenido buenos resultados en la micorrización de plantas a raíz desnuda con especies de *Laccaria* y *Hebeloma* (Le Tacon *et al.*, 1983, 1985; Mauperin *et al.*, 1987; Mortier *et al.*, 1988).

En este trabajo se obtuvieron también buenos resultados aplicando esta técnica de inoculación para la micorrización de *P. pinaster* en contenedor con los hongos ectomicorrícicos *L. bicolor* y *L. decastes*. No obstante, los experimentos realizados con *P. tinctorius* y *R. roseolus*, utilizando el mismo método de producción y aplicación de inóculo, no dieron resultado a ninguna de las dosis probadas. La falta de efectividad de estas últimas especies podría deberse a la sensibilidad del hongo a alguno de los procesos implicados en la producción de este tipo de inóculo. Mientras que el inóculo de *L. bicolor* permanece viable tras períodos de conservación relativamente largos (Mauperin *et al.*, 1987, Parladé, 1992), *P. tinctorius* pierde totalmente su viabilidad tras seis semanas de conservación a 4 °C y la capacidad de crecimiento de algunas especies de *Rhizopogon* se reduce al 43 % durante el mismo período de conservación (Parladé, 1992). La escasa viabilidad del inóculo, unido a la limitada capacidad de crecimiento saprofito imputada a *Rhizopogon* spp. (Molina, 1980), explicarían la ineficacia de este tipo de inóculo para estas especies fúngicas, ya que el hongo no habría prosperado entre la incorporación del inóculo en el sustrato y la formación de las primeras raíces susceptibles de micorrización. La aplicación de este método de inoculación, a la micorrización con *P. tinctorius* y *Rhizopogon* spp., requiere el estudio de modificaciones durante el proceso de producción con vistas a aumentar su viabilidad.

Las técnicas de inoculación con esporas han permitido la micorrización de *P. pinaster* con especies fúngicas, como *R. roseolus* y *S. citrinum*, que habían fracasado al ser aplicadas en forma de inóculo miceliar; o bien, con especies con las que no había sido posible la inoculación debido a la imposibilidad de obtener cultivos puros (*H. vulgare*) o debido a su lento crecimiento en los medios de cultivo habituales (*M. ambiguus*) (Tabla 3.12).

Rhizopogon subareolatus se incluyó en el estudio para determinar si las estructuras observadas en los experimentos de síntesis en cultivo puro con

*P. pinaster*¹ reflejaban la posibilidad de una asociación ectomicorrícica entre ambas especies. La inoculación de *P. pinaster* con esporas de *R. subareolatus* no produjo ectomicorrizas. Sin embargo, la inoculación de abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) con esta misma especie fúngica formaba una abundante micorrización, incluso a concentraciones relativamente bajas (Parladé, 1992). *R. subareolatus* pertenece a la sección *villosuli* del género *Rhizopogon*. Desde el punto de vista de la formación de ectomicorrizas, esta sección se considera específica de abeto Douglas (Molina y Trappe, 1982), mientras que otras especies del género (*R. luteolus*, *R. roseolus*, *R. vulgaris*) muestran una mayor especificidad por *Pinus* spp. (Trappe, 1962).

En la inoculación con *M. ambiguus* y *S. citrinum* se producía un aumento progresivo del porcentaje de micorrización (Fig 3.9 y 3.12) y del número de plantas micorrizadas (Tabla 3.13 y 3.16) al aumentar el número de esporas por planta. No obstante, sobrepasado el nivel de 10^6 esporas/planta, no se producían cambios significativos en el estado micorrícico de las plantas aunque se incrementara la presión de inóculo.

La inoculación con esporas de *R. roseolus* producía un patrón similar en la relación dosis de inóculo - micorrización. No obstante, en este caso, la dosis más alta de inóculo no solo no aumentaba la micorrización de las plantas, sino que producía una ligera disminución del número de raíces infectadas (Fig 3.11). Este fenómeno era más evidente en la inoculación con esporas de *P. tinctorius*, donde la dosis de 10^8 esporas/planta producía un porcentaje de raíces cortas micorrizadas netamente inferior a la dosis de 10^6 esporas/planta (Fig 3.10). Una alta concentración de esporas puede provocar la autoinhibición de su germinación (Gottlieb, 1978), con lo que, sobrepasada una dosis óptima, el porcentaje de micorrización obtenido puede ser menor. Se habían encontrado efectos comparables en la inoculación de *Pinus taeda* con esporas de *P. tinctorius* (Marx, 1976) y abeto Douglas con esporas de *Rhizopogon vinicolor* a dosis bajas de fertilización (Castellano *et al.*, 1985).

1

Ver el capítulo "Hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* en el norte de España"

La inoculación con esporas de *P. tinctorius* producía porcentajes de micorrización inferiores a los obtenidos mediante la utilización de Inóculo miceliar (Fig 3.5 y 3.10) (Marx y Bryan, 1975). No obstante, la utilización de esporas, incluso a dosis relativamente bajas, permitía la obtención de una alta proporción de plantas micorrizadas y con un nivel de micorrización adecuado (Tabla 3.8 y 3.14).

La aplicación de la micorrización controlada, en la producción viverística de plantas para reforestación, requiere la selección de las cepas fúngicas más adecuadas y el desarrollo de métodos de inoculación que permitan su utilización práctica a gran escala. Los estudios realizados han permitido seleccionar una serie de cepas y especies ectomicorrícicas y determinar los métodos de inoculación más efectivos para la micorrización de *P. pinaster* en contenedor (Tabla 3.17).

El efecto de la micorrización controlada sobre el crecimiento de las plantas durante su fase de producción en vivero es muy variable y depende del hongo y la planta implicados, así como del sistema de producción viverística (Castellano y Molina, 1989). En algunos casos, la inoculación con especies como *H. crustuliniforme*, *L. laccata* y *P. tinctorius* produce un incremento en el crecimiento vegetativo de las plantas del vivero (Theodorou y Bowen, 1970; Dixon *et al.*, 1981a; Le Tacon y Bouchard, 1986), en otros casos, con otras combinaciones hongo-planta o con otros sistemas de producción, se ha detectado incluso una reducción del crecimiento de las plantas micorrizadas (Bledsoe *et al.*, 1982; Molina y Chamard, 1983; Stenström *et al.*, 1990).

En general, en un substrato artificial, distinto al suelo natural, y sometido a una fertilización adecuada y regular, la micorrización de las plantas no produce diferencias de crecimiento significativas (Marx y Barnett, 1974; Molina, 1979b, 1980). Muchos de los mecanismos por los cuales el hongo influye en el crecimiento de la planta (exploración de una superficie mayor de suelo, movilización de nutrientes, etc) quedan sin efecto en una producción confinada en contenedor.

En los experimentos de micorrización realizados a lo largo de este trabajo, no se ha detectado, en general, una influencia significativa sobre la estimulación del crecimiento de *P. pinaster* en contenedor. En algunos casos, y especialmente a las dosis más altas de inoculación, se ha observado

incluso una ligera disminución del crecimiento de las plantas, que podría deberse: al elevado consumo de fotosintatos por parte del hongo (Nylund y Wallander, 1989), o al cambio en las condiciones físicas del sustrato provocado por el aumento en la proporción de vermiculita al utilizar dosis elevadas de inóculo micelial.

Tabla 3.17

Técnicas de inoculación y dosis óptima de inóculo para la aplicación de distintas especies ectomicorrícicas seleccionadas en la micorrización controlada de *P. pinaster* en contenedor

Espece fúngica	Método de inoculación ¹	Dosis óptima ²
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	I.M.T.V.	1:8 (i:s)
<i>Laccaria bicolor</i>	I.M.T.V.	1:32 (i:s)
	I.M.A.	0.25 g/l
<i>Laccaria laccata</i>	I.M.T.V.	1:32 (i:s)
<i>Lyophyllum decastes</i>	I.M.T.V.	1:16 (i:s)
	I.M.A.	0.5 g/l
<i>Melanogaster ambiguus</i>	S.E.	10 ⁶ esp/pl
<i>Pisolithus tinctorius</i>	I.M.T.V.	1:8 (i:s)
	M.E.	10 ⁶ esp/pl
<i>Rhizopogon roseolus</i>	S.E.	10 ⁵ esp/pl
<i>Scleroderma citrinum</i>	S.E.	10 ⁵ esp/pl

1 I.M.T.V.= inóculo micelial en turba-vermiculita; I.M.A.= inóculo micelial en alginato polimerizado; S.E.= suspensión acuosa de esporas; M.E.= mezcla de esporas en vermiculita humedecida.

2 (i:s) = inóculo/sustrato, v:v; g/l = gramos de micelio en peso seco por litro de alginato; esp/pl = número de esporas por planta.

No obstante, se ha propuesto que se produce una subestimación de la biomasa fúngica que coloniza el sustrato de crecimiento en forma de micelio externo y rizomorfas (Castellano et al., 1985). Algunos hongos (*Hebeloma*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*) producen una gran abundancia de estas

estructuras, las cuales se destruyen fácilmente durante el muestreo. Si esta masa fúngica se tuviera en cuenta, las plantas micorrizadas podrían presentar una biomasa total superior a la de las plantas no micorrizadas.

El efecto beneficioso del hongo ectomicorrícico debe manifestarse en campo, una vez las plantas sean llevadas a su lugar definitivo de crecimiento (Marx *et al.*, 1991). Los efectos en el vivero pueden permitir una reducción en el tiempo necesario para producir plantas con un tamaño y una calidad fisiológica adecuados para el trasplante, pero incrementar el crecimiento de las plantas en vivero no debe constituir un objetivo en sí mismo. El comportamiento de la simbiosis hongo-planta durante la fase de vivero y tras el trasplante a campo puede ser muy diferente, y hongos que no estimulaban el crecimiento de la planta en vivero pueden dar los mejores resultados en campo (Stenström *et al.*, 1985). Así pues, el test definitivo para determinar el valor de las cepas ectomicorrícicas seleccionadas, lo constituye el establecimiento de plantaciones experimentales para la comparación integrada de resultados a largo plazo.

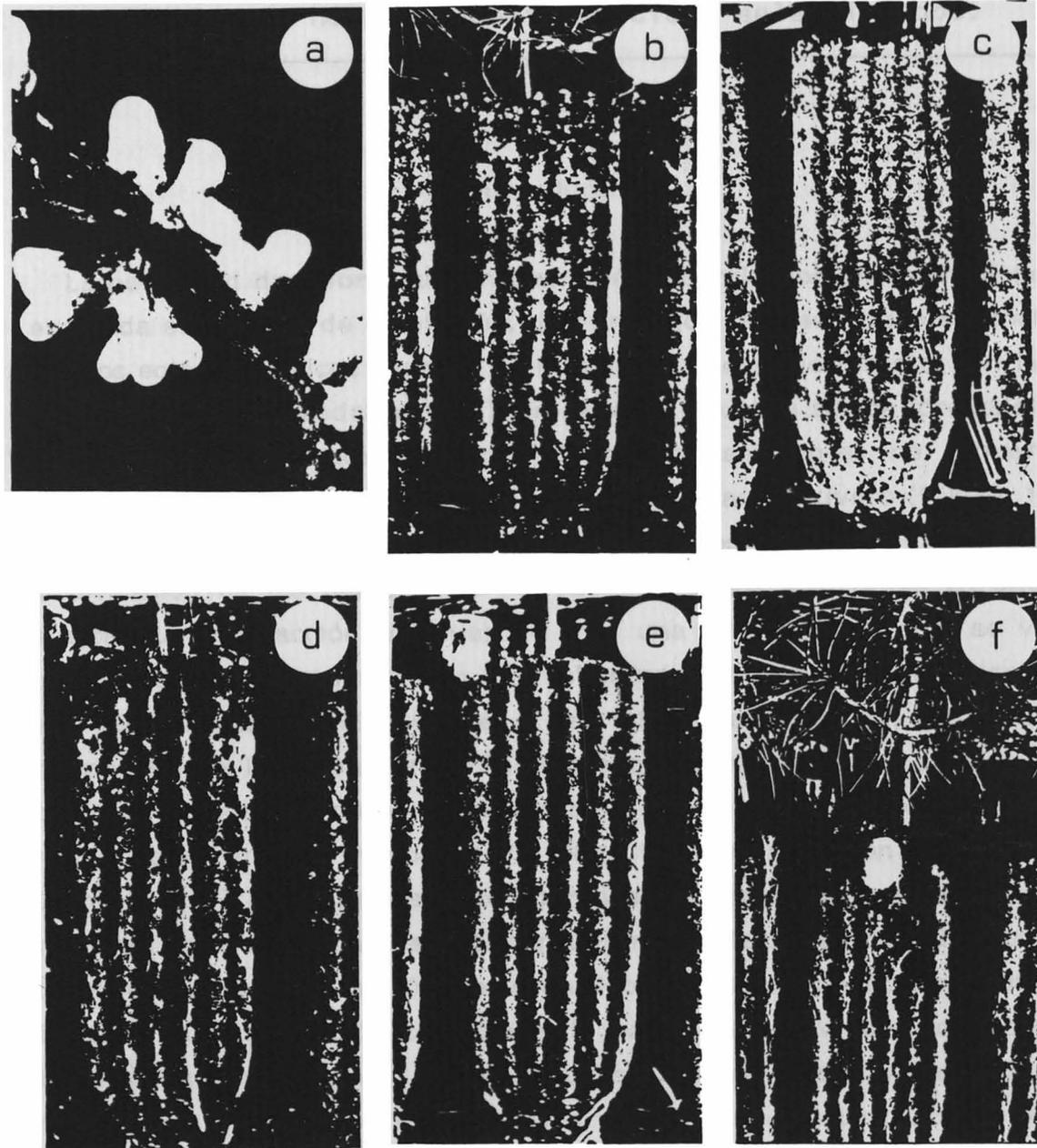


Lámina 3.1

(a) Morfología externa de las ectomicorrizas formadas por *Hymenogaster vulgaris* y *P. pinaster*.

Aspecto macroscópico de los sistemas radicales de *P. pinaster* micorrizados por (b) *Hebeloma crustuliniforme*, (c) *Pisolithus tinctorius*, (d) *Melanogaster ambiguus*, (e) *Rhizopogon roseolus* y (f) *Scleroderma citrinum*.

