

Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorrícicos. experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”

Catalina Carrillo Sánchez

Centro Nacional de Mejora Forestal “El Serranillo”, Ministerio de Medio Ambiente, Apdo. 249, 19080 Guadalajara. España. serranillo@dgcn.mma.es

INTRODUCCIÓN

La adecuada selección de hongos y la posterior manipulación biotecnológica de las micorrizas permite obtener un notable incremento de la productividad de la biomasa vegetal, por lo que las plantas sometidas a micorrización controlada aumentan sustancialmente su viabilidad. Ahora bien, hay que tener en cuenta que no todos los hongos micorrizógenos funcionan igual en un ambiente determinado, como tampoco un hongo concreto es el más efectivo en todos los ambientes. Es fundamental, por tanto, conocer bien la biología de las especies fúngicas y sus exigencias ecológicas, para utilizar la más adecuada, según los distintos ecosistemas donde se ubicarán las plántulas micorrizadas.

La mayor supervivencia en campo de las plantas bien micorrizadas, respecto de las que no lo están, especialmente en condiciones difíciles, es otro factor que define la importancia de una adecuada micorrización en vivero.

Por otra parte, la dinámica existente entre las poblaciones de hongos, capaces de sustituirse unas a otras, nos advierte de la conveniencia de utilizar especies fúngicas cuya micorriza perdure durante varios años en las plántulas inoculadas, cuando estas se instalen definitivamente en el lugar de plantación. Es decir, seleccionar hongos micorrícicos primarios y pioneros, capaces de prosperar en situaciones hostiles de erosionabilidad y transformar suficientemente las condiciones edáficas para iniciar una adecuada sucesión micorrícica y, en general, microbiológica.

FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO DE LA MICORRIZACIÓN EN VIVERO

A) SUSTRATO

El sustrato utilizado en los viveros debe adaptarse de manera que permita una aireación y drenaje suficientes para el buen desarrollo del micelio fúngico (Honrubia *et al.*, 1997), características que también son imprescindibles para un buen desarrollo de la planta (Peñuelas, 1998). Normalmente, una mezcla de turbas, en las que predomine la turba de esfagno, o mezclas 1:1 v/v de turba /vermiculita o perlita, son compatibles con la formación de micorrizas.

Para estudiar el efecto del tipo de sustrato en la micorrización de *Pinus halepensis* se realizó un ensayo con dos cepas de hongos ectomicorrícicos *Pisolithus tinctorius* (3SR) y

Lactarius deliciosus (LDF5). El inóculo utilizado en el caso de la cepa 3SR, fue producido en turba y vermiculita y para la cepa LDF5 en forma de suspensiones miceliarias.

Se ensayaron 2 tipos de sustrato, uno sólo con turba rubia tipo esfagno (VAPO B0) sin fertilizar y otro, con la misma turba mezclada con vermiculita en una proporción turba-vermiculita 75/25 (v/v), de esta forma se pretende aumentar tanto la porosidad como el drenaje del sustrato del cultivo. Para cada tratamiento se dispusieron 4 bandejas de poliestireno expandido, con un total de 100 plantas por tratamiento. Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Porcentajes de planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas de *Pinus halepensis* con las dos cepas ensayadas en relación al tipo de sustrato.

SUSTRATO	<i>Pisolithus tinctorius</i> (3SR)		<i>Lactarius deliciosus</i> (LDF5)	
	% planta micorrizada	Raíces cortas micorrizadas	% planta micorrizada	Raíces cortas micorrizadas
Turba	85,9 a	3,1 a	41,4 a	1,7 a
Turba/verm	92,3 a	3,2 a	37,2 a	1,3 b

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

Los dos sustratos ensayados (turba y turba/vermiculita) se pueden considerar apropiados para la obtención de planta micorrizada en contenedor. Sólo se observaron diferencias en el número de raíces cortas micorrizadas en el caso de la cepa *Lactarius deliciosus* (LDF5).

Asimismo, con ambos tipos de sustrato se obtiene planta de calidad con unos parámetros morfológicos y nutricionales aceptables, observándose sólo algunas diferencias aisladas.

Dado que no se encontraron diferencias en el porcentaje de plantas micorrizadas debido al tipo de sustrato utilizado y que con el sustrato de turba, el contenido de potasio es significativamente mayor, recomendaríamos el uso del sustrato de turba, debido a las ventajas que supone el aumento de potasio sobre la planta (Carrillo, 2000).

B) RIEGO

Las ectomicorrizas facilitan el transporte de agua a las raíces de la planta hospedante, ya que las hifas extramatriciales y los rizomorfos actúan como extensiones del sistema radical y se comportan como estructuras de absorción de agua y nutrientes.

Existen algunos trabajos donde se ha estudiado el efecto de la desecación sobre las micorrizas con diversos resultados. Mientras hay autores que observaron que la formación de micorrizas se ve favorecida por la desecación, otros opinan que no se ve afectada, o incluso disminuida.

En este ensayo se han utilizado contenedores Root-trainer®, de 350 cc de capacidad. Para cada tratamiento se prepararon dos bandejas, con un total de 80 plantas por tratamiento. Se han utilizado dos cepas de *Pisolithus tinctorius* (3SR y 30AM). El inóculo utilizado se ha producido en turba y vermiculita con una dosis de 25 ml/pl.

Se han ensayado 2 niveles de riego, combinados con 3 tipos de fertilización. Se trata de un diseño factorial 2x3x3 (riego x fertilización x tratamiento de micorrización).

Los dos niveles de riego buscaban establecer dos condiciones de aireación en el sustrato. Se estableció un nivel de riego más intenso, en el que se procuró que el sustrato estuviera constantemente saturado de agua y con un nivel de aireación lo más próximo a su porosidad de aireación. Definimos porosidad de aireación como el volumen de aire que existe en el sustrato cuando está saturado de agua (Landis *et al.*, 1990). El segundo nivel de riego buscaba que la aireación del sustrato fuera superior a la porosidad de aireación. Para conseguir más aireación basta simplemente con que la disponibilidad de agua en él sea menor. Sin embargo, esta menor disponibilidad de agua no debe traducirse en un menor desarrollo de la planta. Por lo tanto el segundo nivel de riego buscaba maximizar la aireación del sustrato a base de regar menos pero, a la vez, que la disponibilidad de agua fuera óptima para el desarrollo de la planta.

Para definir los dos niveles de aireación, y por tanto los de riego, se estableció qué relación existía entre la aireación y el potencial hídrico al alba (Ψ_{alba}) de las plantas (Figura 1). Para ello, se emplearon unas bandejas del propio experimento, en las que se determinó periódicamente el Ψ_{alba} de las plantas crecidas en ellas y la porosidad del sustrato. El Ψ_{alba} se determinó con una cámara de Scholander, en ramas laterales. La aireación fue calculada según el método descrito por Landis *et al.* (1990). La porosidad de aireación de la turba estuvo entorno al 15 % y eso coincidió con valores de Ψ_{alba} inferiores a -0,1 MPa. Este fue el primer nivel de riego establecido en el ensayo. Para que las plantas en vivero se puedan desarrollar óptimamente, su potencial hídrico no debe ser inferior a -0,3 MPa (Villar, com. pers.). Para escoger el segundo nivel de riego se tomó el valor de aireación que correspondía a un Ψ_{alba} entre -0,2 y -0,3 MPa. Este valor estuvo entorno al 25 %.

Dado que controlar el estado hídrico de las plantas durante todo el cultivo es muy laborioso, se buscó otro método de control de disponibilidad de agua en el cultivo, relacionado además con la aireación del sustrato. Se optó por controlar los momentos de riego en función de la pérdida de peso de las bandejas del cultivo. Para ello se modelizó la relación que existe entre la pérdida de peso de las bandejas con respecto a su peso máximo en saturación y la aireación del sustrato (Figura 2). Al comenzar el cultivo en abril, una aireación del 25 % correspondió a una pérdida de peso de las bandejas, con respecto a su peso máximo en saturación del 15 %. Esta cifra tuvo que ser ajustada a mitad del cultivo (junio), porque la relación entre pérdida de peso de las bandejas y la aireación del sustrato varía en el tiempo (Figura 2).

Figura 1: Relación entre la aireación del sustrato y el potencial hídrico al alba de las plantas.

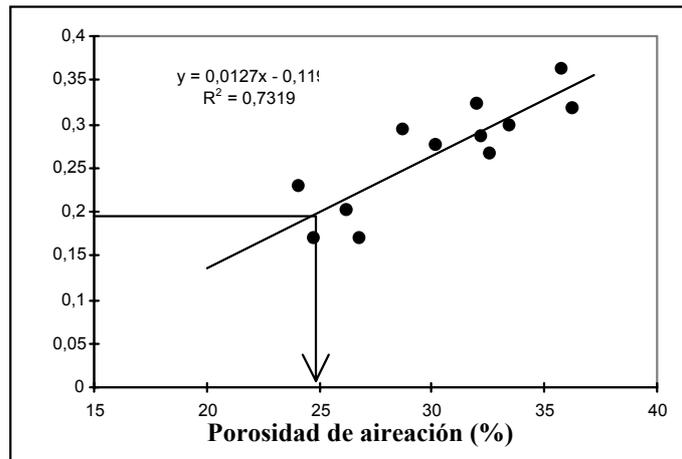
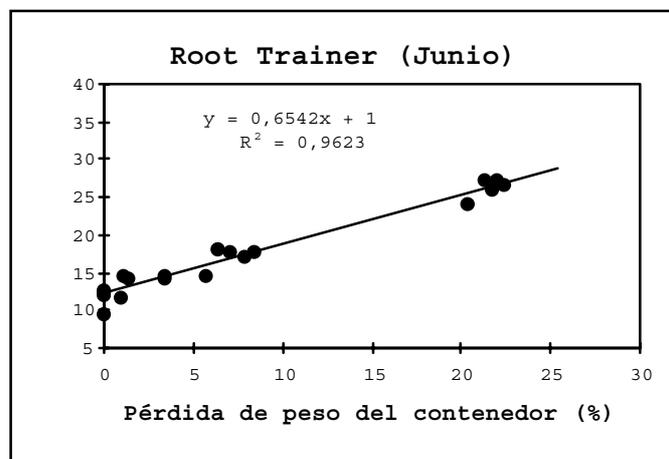
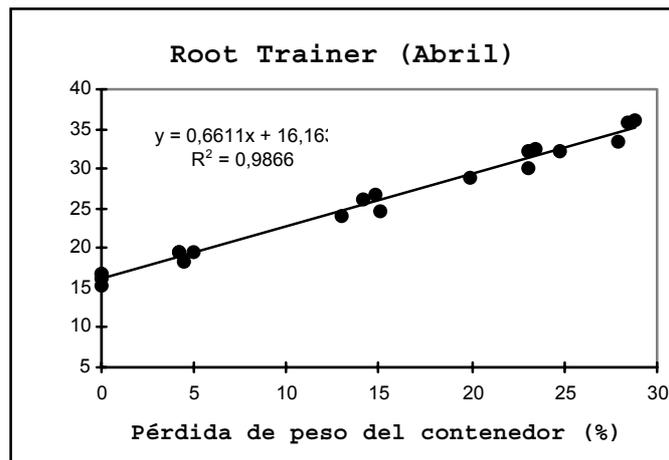


Figura 2: Relación entre la aireación del sustrato y la pérdida de peso de las bandejas, en dos momentos del cultivo.



Por lo tanto, R1 se estableció en torno a un 15 % de aireación, que es la porosidad de aireación del sustrato, y R2 en torno al 25 %. Para mantener el sustrato en constante saturación, las plantas del riego tipo R1 fueron regadas todos los días, mientras que las del tipo R2, cuando las bandejas perdieron un 15 % de su peso.

Cada nivel de riego se combinó con tres tipos de fertilización en las que se diferenciaron las fases de germinación, crecimiento y endurecimiento; las fases primera y última han sido idénticas para los tres tratamientos. El tipo fertilización F1 (fertilización estándar o control) tiene un aporte total de N por planta, durante toda la campaña, de 35 mg, 27 mg de P y 61 mg de K. El tipo F2 es una fertilización rica en N, con un aporte extra de 57,7 mg de N (en forma de nitrato amónico). La fertilización F3 es rica en P, con un aporte extra de 30 mg de P (en forma de H₃PO₄). El método de aplicación fue una fertirrigación con F1 para todas las plantas, y se añadió, entre medias de la fertirrigación y con regadera, el aporte extra de N y P para F2 y F3 respectivamente.

Se observaron diferencias notables entre los porcentajes de micorrización de la cepa 3SR, respecto de la 30AM, siendo siempre mayor en el caso de la cepa 3SR. En cuanto al tipo de fertilización, los porcentajes de micorrización más bajos se obtuvieron con la fertilización rica en N. En cuanto a la influencia del riego, los valores de micorrización más elevados se obtuvieron con el tratamiento que mantenía un 25% de porosidad de aireación (Tabla 2).

Tabla 2: Porcentaje de planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas de *Pinus halepensis*, micorrizado con dos cepas de *Pisolithus tinctorius*, con tres dosis diferentes de fertilización (F1: 35-27-61; F2: 60-27-61; F3: 35-54-61) y dos regímenes de riego (R1: 12-14 % de porosidad de aireación; R2: 25 % de porosidad de aireación) .

FERT.	RIEGO	<i>P.t (3SR)</i>		<i>P.t (30AM)</i>	
		% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
F1	R1	50 b	3,2 b	40,8 a	2,5 a
	R2	75 a	3,9 a	34,6 a	2,5 a
F2	R1	32,5 b	2,5 b	4,16 a	2,5 b
	R2	52,5 a	3,5 a	6,66 a	3,4 a
F3	R1	50 b	2,8 b	19,16 b	2,5 a
	R2	65 a	3,4 a	42,5 a	2,5 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

El número de planta micorrizada siempre ha sido más elevado para el tipo de riego reducido (R2) que para el riego en saturación (R1). Al disponer la planta de menos agua en el sustrato con el tipo de riego R2, se aumenta la cantidad de macroporos en los alveolos (Landis *et al.*, 1990). Esto permite una mayor aireación y un mejor desarrollo de las ectomicorrizas, tal y como demuestran nuestros resultados. Por otro lado, un exceso de agua en el sustrato, favorece la aparición de raíces gruesas (raíces de agua) en detrimento de las raíces cortas

susceptibles de ser micorrizadas (Dixon *et al.*, 1985), por lo que el riego reducido permite un mayor desarrollo de las ectomicorrizas y, por lo tanto, mayores posibilidades de sobrevivir en condiciones de campo después de la plantación (Honrubia *et al.*, 1992). Resultados similares fueron obtenidos por Davies *et al.* (1996), con *Pinus taeda* micorrizado con *Pisolithus tinctorius*, donde la desecación parcial del sustrato de cultivo se tradujo en un aumento de raíces micorrizadas.

El crecimiento de las raíces de *Pinus halepensis* se frena en torno a un potencial de hídrico de -0,7 MPa (Leshem, 1970), y los valores de fotosíntesis disminuyen a partir de un potencial de -0,8 MPa (Melzack *et al.*, 1985). Puesto que el riego R2 se centró en torno a un potencial hídrico de -0,2 MPa no cabe esperar deficiencias en el crecimiento de la planta (Villar *et al.*, 1999). Por tanto, las posibles diferencias en el porcentaje de micorrización y en las variables morfológicas no pueden ser atribuidas a esas deficiencias.

C) FERTILIZACIÓN

Las concentraciones de fósforo y nitrógeno en el suelo influyen directamente en el desarrollo de las micorrizas. Varios experimentos, en los que se compararon diferentes niveles de fertilización en plántulas producidas en contenedor, muestran que la formación de micorrizas está relacionada con los niveles de N y P añadidos al cultivo (Trofymow y van den Driessche, 1991; Bowen, 1994). Estos nutrientes, también pueden afectar a los hongos indirectamente, puesto que la asimilación de nutrientes consume energía y carbohidratos, lo cual puede reducir el carbono disponible para el desarrollo de la cepa fúngica. Altos niveles de nitrógeno y fósforo, reducen la cantidad de carbohidratos en las raíces a niveles demasiado bajos para mantener al hongo simbiote (Wallander, 1992).

En el caso del pino carrasco, se han llevado a cabo varios experimentos en “El Serranillo” y en la Universidad de Murcia, para determinar los niveles de fertilización que optimizan tanto el crecimiento de la planta como el desarrollo de micorrizas.

C1.- Efecto de la dosis de nitrógeno

En este ensayo se ha estudiado el efecto de diferentes regímenes de fertilización nitrogenada en la micorrización de *Pinus halepensis*, por 4 cepas de hongos ectomicorrícicos. Las cepas de hongos ectomicorrícicos ensayadas han sido: 3 cepas de *Pisolithus tinctorius* (3SR, Mx y 30AM), una cepa de *Lactarius deliciosus* (LDF5). En el caso de las 3 cepas de *Pisolithus tinctorius*, el inóculo utilizado ha sido inóculo miceliar producido en turba/vermiculita, y para *Lactarius deliciosus*, en forma de suspensiones miceliarias.

Se ensayaron tres tratamientos diferentes de fertilización nitrogenada (F1, F2 y F3). El aporte extra de N durante la fase de crecimiento, se llevo a cabo mediante regadera. El número de planta para cada tratamiento fue de 100, repartidas en 4 bandejas Poliforest ® de poliestireno expandido con alveolos de plástico de 350 cc.

Los valores de fertilización (N:P:K) utilizados en este ensayo para la fase de germinación y endurecimiento, fue igual para los tres tratamientos. En la fase de crecimiento los valores N:P:K ensayados fueron: F1: 35-27-61; F2: 60-27-61; F3: 120-27-61.

Todas las cepas ensayadas formaron micorrizas a los distintos niveles de fertilización. El parámetro raíces cortas micorrizadas no presentó diferencias significativas, para ninguno de los tratamientos ensayados, excepto para la cepa 3SR (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas de *Pinus halepensis*, micorrizado con tres cepas de hongos ectomicorrícicos, con tres dosis diferentes de fertilización nitrogenada (F1: 35:27:61; F2: 60:27:61; F3:120:27:61).

CEPA FUNGICA	Fertilización	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
<i>Pisolithus tinctorius</i> (3SR)	F1	62 a	1,9 a
	F2	56 a	1,4 b
	F3	30 b	1,4 b
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Mx)	F1	25,2 a	1 a
	F2	18 b	1,2 a
	F3	21 b	0,8 a
<i>Lactarius deliciosus</i> (LDF5)	F1	38 a	1 a
	F2	32 b	1,3 a
	F3	32 b	1,1 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

C2.- Efecto de la fuente de nitrógeno

Se ensayaron tres tratamientos diferentes que corresponden a distintas fuentes de nitrógeno: Nitrato amónico (NH_4NO_3), amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). El fertilizante utilizado durante el cultivo fue Peter's Professional ® con unos valores NPK en la fase de germinación 7-40-70, en la fase de crecimiento 20-7-19 y en la de endurecimiento 4-25-35. El amonio se añadió al cultivo en forma de sulfato amónico al 21%, y el nitrato como ácido nítrico al 59 %, en la fase de crecimiento de las plantas y con regadera.

Las cepas utilizadas en este ensayo fueron *Pisolithus tinctorius* (3SR) y *Lactarius deliciosus* (LDF5). En el caso de la cepa de *P. tinctorius*, el inóculo utilizado fue producido en turba/vermiculita, y para *L. deliciosus*, en forma de suspensiones miceliarias.

El número de planta para cada tratamiento fue de 100, repartidas en 4 bandejas Poliforest ® de poliestireno expandido con alveolos de plástico de 350 cc.

Cuando la fuente de nitrógeno aportada fue nitrato amónico, el porcentaje de planta micorrizada observado fue menor que cuando el N se aportó como nitrato o amonio, aunque los porcentajes para ambas cepas con esta fuente de nitrógeno, fueron bastante elevados (Tabla 4)

Tabla 4: Porcentaje planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas de *Pinus halepensis*, micorrizado con dos cepas de hongos ectomicorrícicos, con tres fuentes de nitrógeno (NH₄ NO₃; NH₄ y NO₃).

FUENTE NITROGENO	<i>Pisolithus tinctorius</i> (3SR)		<i>Lactarius deliciosus</i> (LDF5)	
	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
NH ₄ NO ₃	85,9 b	3,1 a	41,4 b	1,7 a
NH ₄	91,5 a	2,3 b	55,9 a	1,9 a
NO ₃	98,2 a	3,1 a	55,3 a	1,8 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

C3.- Influencia de la dosis de fósforo

En este ensayo se ha estudiado el efecto de diferentes regímenes de fertilización fosforada en la micorrización de *Pinus halepensis*. Para ello, se prepararon tres soluciones nutritivas que diferían en la concentración de P: F1: 22-3,5-19; F2: 20-7-19 (fertilización estándar o control); F3: 20-14-19.

Las sales utilizadas fueron: NO₃K, (NO₃)₂Ca.4H₂O, (NH₄)₂SO₄, NaH₂PO₄, y como aporte de micronutrientes, un preparado comercial (NUTREL®), conteniendo B (0,7%), Cu (0,3%), Fe (7,5%), Mn (3,3%), Mo (0,2 %) y Zn (0,6 %).

En este caso las plantas recibieron una fertilización continua a lo largo de todo el ensayo (sin diferenciar en fases de germinación, crecimiento y endurecimiento), de manera que cada planta recibía 4,4 mg N por fertilización. El fertilizante se aplicó mediante riego, con la solución nutritiva convenientemente diluida, y a la dosis de 10 ml/planta. El aporte total a lo largo del cultivo fue de 35 mg de N y 61 de K: F1: 35-13,5-61; F2: 35-27-61; F3: 35-54-61.

Las cepas utilizadas en este ensayo fueron *Pisolithus tinctorius* (3SR) y *Lactarius deliciosus* (LDF5). En el caso de la cepa de *Pisolithus tinctorius*, el inóculo utilizado fue inóculo miceliar producido en turba/vermiculita, y para *Lactarius deliciosus*, en forma de suspensiones miceliarias

El número de planta para cada tratamiento fue de 100, repartidas en 4 bandejas Poliforest® de poliestireno expandido con alveolos de plástico de 350 cc. Para éste ensayo, el sustrato de cultivo fue esterilizado en autoclave a 120 °C durante una hora, dos veces en días alternos.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. La cepa 3SR presentó unos porcentajes de planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas del 100 % sin que la dosis de fósforo aportada influyera en estos porcentajes.

Tabla 5: Porcentaje planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas de *Pinus halepensis*, micorrizado con dos cepas de hongos ectomicorrícicos, con tres dosis diferentes de fertilización fosforada (F1: 35-13,5-61; F2: 35-27-61; F3: 35-54-61).

CEPA FUNGICA	Fertilización	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
<i>Pisolithus tinctorius</i> (3SR)	F1	100 a	5 a
	F2	100 a	5 a
	F3	100 a	4,8 a
<i>Lactarius deliciosus</i> (LDF5)	F1	17,6 b	2 a
	F2	37,6 a	2 a
	F3	22 b	2 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

Los porcentajes de planta micorrizada más bajos, se observaron con los regímenes de fertilización que contenían mayor cantidad de nitrógeno. Esto sugiere que altos niveles de este elemento inhiben la micorrización, tal y como han demostrado otros autores con diferentes especies vegetales y fúngicas (Holopainen y Heinonen-Tanski, 1993; Wilkund *et al.*, 1995). El exceso de nitrógeno reduce la biomasa fúngica en plantas micorrizadas. Esta reducción es más pronunciada para el micelio extramatricial que para la biomasa fúngica de las raíces. De esta forma, aunque las raíces micorrizadas prosiguen su desarrollo de forma más lenta, el crecimiento del micelio extramatricial se encuentra fuertemente inhibido o incluso desaparece.

Se trata, por tanto, de encontrar la concentración de N lo suficientemente elevada como para no dañar el crecimiento de la planta, y, a la vez, permitir una micorrización aceptable. En el caso concreto de *Pinus halepensis*, se puede afirmar que un aporte de N de 35 mg, a lo largo de la campaña de cultivo, es óptimo para la obtención de planta micorrizada, sin detrimento de los parámetros morfológicos de la planta (Carrillo, 2000).

En relación a la fuente de nitrógeno utilizada, nuestros resultados muestran que tanto con amonio como con nitrato, el número de planta micorrizada es más elevado que al utilizar nitrato amónico. Para algunos autores, el amonio es mejor fuente de nitrógeno que el nitrato basándose en el hecho de que para reducir el nitrato a amonio se produce un consumo de energía, reduciendo de esta manera la cantidad de carbohidratos disponible para el desarrollo del hongo. Sin embargo, otros autores mantienen que el nitrato es mejor fuente de nitrógeno que el amonio. En las condiciones ensayadas, no se observaron diferencias entre las dos fuentes de nitrógeno y ambas mostraron un alto porcentaje de plantas micorrizadas.

Las dosis de fósforo sólo tuvieron efecto en el caso de la cepa *Lactarius deliciosus* (LDF5). Sin embargo, la micorrización por *P. tinctorius* no se vio afectada por el P. En el ensayo de régimen de riego combinado con la fertilización, tampoco se encontraron diferencias al aumentar la dosis de fósforo, mostrando que el nivel de P sólo tuvo un pequeño

efecto en el desarrollo de las ectomicorrizas de *P. tinctorius*. Estos resultados coinciden con los trabajos de otros autores donde se muestra que el efecto del fósforo sobre el desarrollo de las ectomicorrizas fue apenas apreciable. Parece ser que la combinación de altos niveles de fósforo y nitrógeno tiene un efecto mayor en el desarrollo de las ectomicorrizas que altas dosis de fósforo por sí solas (Wallander, 1992).

Las plantas micorrizadas con diferentes cepas de *P. tinctorius* presentaron mayor altura que las no micorrizadas a las dosis más bajas de nitrógeno, mientras que no se encontraron diferencias al aumentar la dosis de este elemento. Al aplicar las distintas dosis de fósforo se obtuvieron resultados equivalentes. Sólo a la dosis de fósforo más elevada no se encontraron diferencias en la altura de las plantas micorrizadas con la cepa *P. tinctorius* (3SR) y el control. Este incremento de crecimiento, inducido por las ectomicorrizas, es más claro a dosis bajas de fertilizante. Resultados similares fueron obtenidos en experimentos con especies de *Pinus* y cepas de *P. tinctorius* y otros hongos ectomicorrícicos (Hatchell y Marx, 1987; Väre, 1989; Rousseau y Reid, 1991, Díaz y Honrubia, 1998, 1999)

En cuanto al contenido de nutrientes, cuando se ensayaron dosis crecientes de P el contenido de fósforo, tanto foliar como radical, fue siempre mayor al aumentar la dosis de este elemento en el sustrato. Las plantas micorrizadas presentaron mayor cantidad de fósforo en las acículas y en la raíz que las plantas no micorrizadas corroborando por tanto, que las micorrizas pueden aumentar la acumulación de fósforo en los tejidos de la planta

En todos los ensayos realizados, el contenido de potasio de las plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* (sobre todo con la cepa 3SR) fue superior al contenido de este elemento en las plantas control.

D) PESTICIDAS

Muchos de los fungicidas que se utilizan en vivero para controlar las enfermedades que afectan a las plantas, pueden afectar también al desarrollo de ectomicorrizas (Pawuk *et al.*, 1980; Marx y Rowan, 1981; Landis *et al.*, 1990). Los fungicidas que afectan al hongo micorrícico o a la formación de micorrizas pueden influir en la productividad del vivero mejorándola o empeorándola (Trappe *et al.*, 1984).

Algunos estudios en plántulas de pino muestran el efecto de varios fungicidas sobre el desarrollo de ectomicorrizas, tanto naturales en condiciones de campo como las obtenidas por inoculación en condiciones de vivero. Estos resultados que se tienen sobre diferentes especies de hongos y de distintos fungicidas son diversos y, en muchos casos, contradictorios

Por ello, en “El Serranillo”, se diseñó un experimento con el fin de determinar el efecto de diversos fungicidas de aplicación habitual en el vivero sobre la micorrización en pino carrasco.

Las cepas utilizadas fueron dos de *Pisolithus tinctorius* (3SR y 30AM) y una de *Lactarius deliciosus* (LDF5). El inóculo utilizado en el caso de las dos cepas de *Pisolithus tinctorius*, fue inóculo en turba y vermiculita y en el caso de la cepa LDF5, en forma de suspensiones miceliarias.

Con el fin de adecuarnos al uso habitual de los fungicidas en vivero, los fungicidas se aplicaron de manera conjunta, en distintas fases del cultivo de las plantas, alternándolos para

evitar resistencias. Los fungicidas ensayados y el calendario de aplicación aparecen a continuación:

- 05-05-98.- tachigaren (1,5 cm³/l) + rovrál (1,3 g/l)= 3 l/m²
- 27-05-98.- previcur (2 cm³/l) + benomilo (2 g/l)= 3 l/m²
- 09-06-98.- benomilo (2 g/l) + captan (3 g/l)= 2 l/m²
- 25-06-98.- benomilo (2 g/l) + tiram (2 g/l)= 2 l/m²
- 16-07-98.- benomilo (2 g/l) + captan (3 g/l)= 2 l/m²
- 22-07-98.- benomilo (2 g/l) + tiram (2 g/l)= 2 l/m²
- 05-08-98.- benomilo (2 g/l) + captan (3 g/l)= 2 l/m²
- 19-08-98.- benomilo (2 g/l) + tiram (2 g/l)= 2 l/m²
- 16-09-98.- benomilo (2 g/l) + captan (3 g/l)= 2 l/m²
- 08-10-98.- benomilo (2 g/l) + tiram (2 g/l)= 2 l/m²

El número de planta para cada tratamiento fue de 100, repartidas en 4 bandejas Poliforest®.

Las tres cepas utilizadas en este ensayo formaron micorrizas al aplicar los fungicidas. Los resultados de éste ensayo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Porcentaje de plantas micorrizadas y raíces cortas micorrizadas de las tres cepas frente a los tratamientos ensayados. F+: Tratamiento con fungicidas, F-: Tratamiento sin fungicidas.

Cepa fúngica	Fungicida	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
<i>Pisolithus tinctorius</i> (3SR)	F+	35 b	2,5 a
	F-	62 a	2,9 a
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Mx)	F+	34 a	2,6 a
	F-	25,2 a	2 b
<i>Lactarius deliciosus</i> (LDF5)	F+	28 a	2,1 a
	F-	38 a	2,1 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

El pino carrasco es una especie muy sensible a los ataques de hongos en el vivero (Peñuelas y Ocaña, 1996), por lo que es necesario el uso de fungicidas, para prevenir las enfermedades criptogámicas a lo largo del cultivo. A la vista de los resultados obtenidos, podemos recomendar el uso de fungicidas, incluso si se pretende realizar un programa de micorrización en el vivero. No obstante, sería aconsejable realizar pruebas preliminares con las cepas de hongos ectomicorrícicos seleccionadas para dicho programa, o bien, cambiar en el tratamiento aquellos fungicidas que *in vitro* se hayan visto más perjudiciales, ya que los efectos de los fungicidas sobre los hongos ectomicorrícicos son muy variables (Carrillo, 2000).

D) INOCULO ECTOMICORRÍCICO

El inóculo miceliar es uno de los tipos de inóculo más utilizado para micorrizar plantas en vivero. Con este inóculo nos aseguramos el trabajar con la cepa o aislado fúngico elegido previamente y evitamos introducir organismos indeseados como patógenos al sistema de cultivo (Brundrett *et al.*, 1996). Este micelio puede ser aplicado en una mezcla de turba y vermiculita, en forma de suspensiones miceliarias, o incluido en geles de polímeros inertes.

El inóculo producido en turba y vermiculita ha sido uno de los tipos más usados para programas de inoculación controlada en vivero (Marx y Kenney, 1982; Harvey *et al.*, 1991).

El micelio incluido en geles de alginato es un buen método de producción de inóculo de hongo ectomicorrícico (Le Tacon *et al.*, 1983; Kuek *et al.*, 1992). Este método es eficaz para especies de hongos que soporten bien la fragmentación y en el caso de algunas especies, las concentraciones de Cl_2Ca necesarias para su producción.

Otro tipo de inóculo utilizado en programas de inoculación son las suspensiones miceliarias (Parladé *et al.*, 1996; Honrubia *et al.*, 1997). Este inóculo tiene la ventaja de que su preparación es sencilla y que se puede mecanizar con relativa facilidad en viveros comerciales.

Para el caso concreto del pino carrasco se realizaron una serie de ensayos que se describen a continuación.

D1.- Capacidad infectiva de 6 cepas de *Pisolithus tinctorius*, en relación a la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo.

Las cepas utilizadas en este ensayo fueron: 3SR, 30AM, PtF3, CA01EU, Mx y U8. Se utilizaron dos tipos de inóculo, inóculo miceliar producido en turba y vermiculita y suspensiones miceliarias. En el caso de las suspensiones miceliarias, al medio de cultivo se le añadió 1,5 g de agar/l para favorecer el crecimiento del hongo y, una vez crecido éste, se fragmentó durante unos pocos segundos para homogeneizar la suspensión. Para los dos tipos de inóculo, el medio MMN fue producido con la cantidad normal de glucosa (10 g), según fórmula original, y con la mitad de glucosa (5 g).

La dosis de inóculo para el micelio producido en turba y vermiculita fue de 25 ml inóculo/alveolo y de 10 ml inóculo/alveolo en el caso de las suspensiones miceliarias. Para cada tratamiento se dispusieron 2 bandejas de poliestireno expandido, con un total de 112 plantas por tratamiento.

En todas las cepas ensayadas, y para los dos tratamientos, el número de planta micorrizada al aplicar el inóculo en forma de suspensiones miceliarias fue muy bajo (Tabla 7). En cambio, al utilizar como inóculo turba y vermiculita, los porcentajes de planta micorrizada fueron sensiblemente más elevados (Tabla 8).

Tabla 7: Porcentaje de micorrización de las 6 cepas ensayadas, con el inóculo en forma de suspensiones miceliarias (ensayo A). (G+: 10 g de glucosa; G-: 5 g de glucosa).

MEDIO	% PLANTAS MICORRIZADAS					
	3SR	30AM	PtF3	CA01EU	Mx	U8
G+	3,5 a	5,6 a	8,3 a	5,7 a	9,5 a	2,7 a
G-	4,2 a	5,3 a	9,1 a	6,2 a	9,7 a	3,1 a

Valores dentro de una misma columna seguidos de la misma letra, no son estadísticamente diferentes según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$).

Aunque los porcentajes de planta micorrizada fueron ligeramente más elevados al utilizar el inóculo con la cantidad normal de glucosa, no se encontraron diferencias en ninguna de las cepas ensayadas (Tabla 8).

Tabla 8: Porcentajes de plantas micorrizadas y raíces cortas micorrizadas de las cepas ensayadas con el inóculo en turba y vemiculita. (G+: 10 g de glucosa; G-: 5 g de glucosa).

CEPA FUNGICA	MEDIO MMN	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
3SR	G+	58 a	2,1 a
	G-	41,9 a	2,1 a
30AM	G+	30.3 a	1.7 a
	G-	21.4 a	1.6 a
PtF3	G+	26.78 a	1.5 a
	G-	22.3 a	1.2 a
CA01EU	G+	18.75 a	2.3 a
	G-	17.85 a	2.1 a
Mx	G+	91.07 a	2.4 a
	G-	89.28 a	2.5 a
U8	G+	9,8 a	1.1 a
	G-	14.28 a	1.5 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

Una practica habitual a la hora de producir inóculo para programas de inoculación en vivero, es disminuir la cantidad de glucosa en el medio. De esta forma, se pretende conseguir que el hongo sea más agresivo favoreciendo así el establecimiento de la simbiosis micorrícica. Con las cepas fúngicas y especie vegetal ensayadas, no se observaron diferencias, ni en el porcentaje de plantas micorrizadas, ni en el número de raíces cortas micorrizadas, mostrando que la reducción de la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo no es determinante a la hora de favorecer el desarrollo posterior de las micorrizas en vivero (Carrillo, 2000).

En general, los inóculos que mejores resultados producen son el inóculo sólido con la cantidad mayor de glucosa en el medio. Las suspensiones miceliales o “slurries”, no parecen funcionar con *P. tinctorius*.

D2.- Efecto del tipo de inóculo sobre la capacidad infectiva de varios hongos ectomicorrícicos.

Las cepas de hongos ectomicorrícicos utilizadas han sido: *Cenococcum sp* (Cn), *Lactarius deliciosus* (LDF5), *Pisolithus tinctorius* (3SR), *Suillus collinitus* (SIM_I y HX_{I2}) y HX_{I1}. Se ha ensayado inóculo miceliar producido en turba y vermiculita, incluido en gel de alginato y en forma de suspensiones miceliales. Para la cepa LDF5, se utilizó inóculo en gel de alginato y suspensiones miceliales.

La dosis de inóculo para turba y vermiculita fue de 25 ml inóculo/alveolo, de 10 ml/alveolo para las suspensiones miceliales y de 20 ml inóculo/alveolo para el inóculo incluido en gel de alginato. Para cada tratamiento se dispusieron 2 bandejas de poliestireno expandido, con un total de 112 plantas por tratamiento.

Dependiendo de la cepa, la cantidad de planta micorrizada obtenida varió según el tipo de inóculo. La cepas Cn y LDF5, obtuvieron los porcentajes de planta micorrizada más elevados al utilizar suspensiones miceliales. El inóculo en turba y vermiculita fue más efectivo con las cepas 3SR y HX_{I1}. En cuanto al inóculo incluido en gel de alginato, las cepas *Suillus collinitus* (Sim_I y HX_{I2}) y HX_{I1} fueron las únicas capaces de formar micorrizas con unos porcentajes aceptables (Tabla 9).

En general, los valores más altos de micorrización corresponden al inóculo producido por fermentación solida, especialmente en el caso de *P. tinctorius*. En cuanto al inóculo en forma de suspensión miceliar o “slurry”, el valor de micorrización más elevado corresponde a la cepa LDF5.

Tabla 9: Porcentajes plantas micorrizadas y raíces cortas micorrizadas de los sistemas radicales en función del tipo de inóculo ensayado.

CEPA FUNGICA	INOCULO	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
<i>C.sp.(Cn)</i>	turba/verm	0	-
	suspensiones	35,7	1.4
	alginato	0	-
<i>L.d. (LDF5)</i>	turba/verm	-	-
	suspensiones	50 a	1.4
	alginato	2 b	-
<i>P.t. (3SR)</i>	turba/verm	58 a	2.1
	suspensiones	3 b	-
	alginato	0	-
<i>S.c. (Sim₁)</i>	turba/verm	24,1 a	2 a
	suspensiones	30,35 a	1.8 a
	alginato	24,9 a	2.7 b
<i>S.c. (HX₁₂)</i>	turba/verm	31,2 a	1.9 a
	suspensiones	24,1 a	1.9 a
	alginato	28,55 a	2 a
<i>HX₁₁</i>	turba/verm	34 a	2.8 b
	suspensiones	18,75 a	2.1 a
	alginato	25,8 a	2 a

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

D3.- Efecto de la dosis de inóculo sobre la capacidad infectiva de 3 cepas de hongos ectomicorrícicos

Se utilizaron 2 cepas de *Pisolithus tinctorius* (3SR y Mx) y una cepa de *Lactarius deliciosus* (LDF5). Se ensayaron tres tipos de inóculo miceliar, producido en turba y vermiculita, incluido en gel de alginato y suspensiones miceliar.

Las dosis para el inóculo en turba y vermiculita fueron 40, 25 y 15 ml / alveolo. En el caso del inóculo incluido en gel de alginato, las dosis fueron 30, 20 y 10 ml / alveolo. Para las suspensiones miceliar 15, 10 y 5 ml / alveolo, excepto en el caso de la cepa LDF5 que, se ensayaron las dosis media y baja solamente.

En el caso de las cepas 3SR y Mx, sólo se obtuvieron resultados positivos de micorrización, al aplicar el inóculo en turba y vermiculita. Con la cepa LDF5, el único inóculo que formó ectomicorrizas fueron las suspensiones miceliar.

En todos los casos, con la dosis media y alta de inóculo, se obtuvieron porcentajes similares de planta micorrizada, observándose un descenso en la micorrización con la dosis más baja ensayada (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentajes de planta micorrizada y raíces cortas micorrizadas de *Pinus halepensis* con las tres cepas ensayadas en relación con la dosis de inóculo.

CEPA FUNGICA	INOCULO	DOSIS (ml/planta)	% planta micorrizada	raíces cortas micorrizadas
<i>L.d. LDF5</i>	Suspensiones miceliars	10	38 a	2 a
		5	11,9 b	2 a
<i>P.t. 3SR</i>	Turba/verm	40	67 a	1,9 a
		25	58 a	2,1 a
		15	29,4 b	1,7 b
<i>P.t. Mx</i>	Turba/verm	40	22,6 a	2,5 a
		25	25,2 a	2 b
		15	5,35 b	1,9 b

Dentro de una misma columna, y para cada tratamiento de fertilización, los valores seguidos de la misma letra, no son estadísticamente significativos según el análisis de tablas de contingencia ($p \leq 0,05$), para el % de plantas micorrizadas y según el test de Duncan ($p \leq 0,05$), para las raíces cortas micorrizadas.

Por otro lado, no se observaron diferencias en los parámetros morfológicos entre las plantas control y las plantas micorrizadas, en los ensayos sobre la capacidad infectiva de *P. tinctorius* y sobre el tipo de inóculo. Hay que tener en cuenta que, en general, en un sustrato artificial y con unos aportes de fertilización adecuados, la micorrización no produce diferencias de crecimiento significativas (Molina, 1980; Díaz y Honrubia, 1999). Muchos de los beneficios de la simbiosis sobre la planta hospedante no se observan en un espacio tan reducido como es un contenedor y con una dosis de fertilización adecuada.

Sin embargo, cabe destacar que todas las plantas micorrizadas en estos ensayos cumplieron los criterios de calidad de planta forestal, según la normativa española para *Pinus halepensis* de una savia, tales como una altura mínima de 10 cm y un diámetro de cuello de raíz de 2 cm (Peñuelas, 1999).

En cuanto al contenido de nutrientes, las distintas cepas de *Pisolithus tinctorius* presentaron diferencias en cuanto a su capacidad para absorber nitrógeno. Las plantas micorrizadas con la cepa 3SR presentaron un contenido de P en la parte radical superior al resto de las plantas micorrizadas y a las control. Esto podría deberse a la acumulación de este elemento en el manto fúngico de la micorriza (Harley y Smith, 1983).

El contenido de potasio en las plantas tiene un papel muy importante en el ajuste osmótico y en la regulación de la apertura estomática, contribuyendo a la disminución de pérdidas por transpiración (Oliet, 1998). Las plantas micorrizadas con las cepas de *Pisolithus tinctorius* 3SR y 30AM y con la cepa HX_{II}, presentaron un contenido en potasio significativamente más elevado que las plantas control. Esto supone una ventaja para la planta micorrizada ya que al tener más potasio, la planta puede resistir mejor periodos de sequía y de esta manera conseguir una mayor supervivencia al ser transplantada a campo. En definitiva, se traduce en una mejora ecofisiológica que aporta el hongo de la micorriza; en este caso, las tres cepas indicadas.

CONCLUSIONES

1.- La cepa *Pisolithus tinctorius* (3SR) se ha evidenciado como una excelente candidata para programas de inoculación en vivero con *Pinus halepensis*. Esta cepa ha presentado unos porcentajes de micorrización elevados. Asimismo, la micorrización con la especie comestible *Lactarius deliciosus* (LDF5) es factible a media-gran escala, debido a los métodos de producción e incorporación del inóculo en vivero.

2.- La eficacia del tipo de inóculo varía según la especie fúngica. Así para las cepas de *Pisolithus tinctorius*, el inóculo más eficaz es el producido en turba y vermiculita; en cambio, para *Lactarius deliciosus* (LDF5) y *Cenococcum geophilum* (Cn) son las suspensiones miceliarias. Las cepas de *Suillus collinitus* (Sim_I y Hx₁₂) y la cepa Hx₁₁ formaron micorrizas con los tres tipos de inóculo. Unas dosis de aplicación de 25 ml/pl, en el caso del inóculo en turba y vermiculita, y de 10 ml/pl para las suspensiones miceliarias, se consideran óptimas para la obtención de planta micorrizada. Aumentos de estas dosis no conllevan incrementos en los porcentajes de micorrización. La reducción de la cantidad de glucosa en el medio de cultivo no es determinante a la hora de favorecer el desarrollo de las micorrizas en vivero.

3.- El uso de fungicidas en vivero, necesario para el cultivo de pino carrasco, dada su sensibilidad a los hongos patógenos, en esta fase del desarrollo, no afecta negativamente el proceso de micorrización controlada.

4.- Un incremento de la fertilización nitrogenada se traduce en una disminución de la micorrización. Para pino carrasco, un aporte de nitrógeno de 35 mg/pl es suficiente para la obtención de planta micorrizada sin detrimento de los parámetros morfológicos de la planta. Tanto amonio como nitrato permiten unos buenos niveles de micorrización. La aportación de nitrato amónico no mejora la micorrización de pino carrasco.

5.- El efecto del fósforo, en las dosis utilizadas, sobre la micorrización es apenas apreciable.

6.- Un régimen de riego reducido (25% de porosidad de aireación) favorece la micorrización sin mermas en el crecimiento de las plantas.

7.- No se pueden establecer pautas generales de estimulación del crecimiento debido a la micorrización en la fase de vivero. *Lactarius deliciosus* no repercute en mejoras morfométricas en las plantas micorrizadas. Sin embargo, algunas cepas de *Pisolithus tinctorius* (3SR y Mx) tienen un efecto positivo sobre el crecimiento y mejora nutricional de las plantas.

8.- El incremento en la asimilación de potasio observado en plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* en vivero, se puede considerar una importante ventaja para su posterior trasplante a campo, debido a la mejora en la resistencia a la sequía. En algunos casos se observó una mejora en la nutrición fosforada de las plantas micorrizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bowen, G.D. 1994. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. En: *Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry*. A. D. Robson; L. K. Abbott; N. Malajczuk (eds.). Kluwer Academic Publishers. pp 61-67.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. y Malajczuk, N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32, 374 pp.
- Carrillo, C. 2000. Producción de inóculo de hongos ectomicorrícicos y micorrización controlada de *Pinus halepensis* Miller en vivero. Tesis Doctoral
- Davies, F.T.Jr.; Suenson, S.E.; Cole, J.C.; Phavaphutanon, L.; Duray, S.A.; Olalde-Portugal, V.; Meier, C.E. y Bo, S.H. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol.* 16: 985-993.
- Díaz, G. y Honrubia, M. 1998. Factors affecting mycorrhizal infection of containerized *Pinus halepensis* by *Suillus* sp., *Rhizopogon* sp. and *Pisolithus tinctorius* in nursery conditions. Abstracts Second International Conference on Mycorrhiza. ICOM II, 51
- Díaz, G. y Honrubia, M. 1999. Crecimiento y nutrición de plántulas micorrizadas de *Pinus halepensis* bajo diferentes regímenes de fertilización. II Congreso Latinoamericano de Micología. Venezuela.
- Dixon, R.K., Behrns, G.T., Garret, H.E., Cox, G.S. y Sander, I.L. 1985. Synthesis of ectomycorrhiza on container-grown oak seedlings. *South. J. Appl. For.*, 9 (2): 95-99
- Harley, J. L. y Smith, S. E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. London.
- Harvey, A.E.; Jurguensen, M.F. y Larsen, M.J. 1991. Clearcut harvesting and ectomycorrhizae: survival of activity on residual roots and influence on bordering forest stand in western Montana. *Can. J. For. Res.* 10: 300-303.
- Hatchel, G.E. y Marx, D.H. 1987. Response of longleaf, sand, and loblolly pines to *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae and fertilizer on a sandhills site in South Carolina. *For. Sci.* 33: 301-315.
- Holopainen, T. y Heinonen-Tanski, H. 1993. Effects of different nitrogen sources on the growth of Scots pine seedlings on the ultrastructure and development of their mycorrhizae. *Can. J. For. Res.* , 23: 362-372.
- Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G. y Cano, A. 1992. *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Proyecto LUCDEME VIII. Monografías, 54.
- Honrubia, M., Díaz, G. y Gutiérrez, A. 1997. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. Actas II Congreso Forestal Español. I. Congreso Forestal Hispano Luso. IRATI 97, 3: 301-306
- Kuek, C.; Tommerup, I.C. y Malajczuk, N. 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. *Mycol. Res.* 96: 273-277.
- Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E. y Barnett, J.P. 1990. The Biological component: Nursery Pest and Mycorrhizae. In: *The Container Tree Nursery Manual*. USDA Forest Service. Washington.
- Le Tacon, F. ; Jung, G.; Michelot, P. y Mugnier, M. 1983. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Ann. Sci. For.* 40: 165-176.

- Leshem, B. 1970. Resting roots of *Pinus halepensis*: structure, function and reaction to water stress. *Bot. Gaz.* 131 (2): 99-104.
- Marx, D.H. y Rowan, S.J. 1981. Fungicides influence growth and development of specific ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings. *For. Sci.*, 10: 167-176
- Marx, D.H. y Kenney, D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. En: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. N. C., Schenk, (ed.) An. Phytopathol. Soc., St Paul. MN, 244 pp.
- Melzack, R.N.; Bravdo, B. y Riov, J. 1985. The effect of water stress on photosynthesis and related parameters in *Pinus halepensis*. *Physiol. Plant.* 64: 295-300.
- Molina, R. 1980. Ectomycorrhizal inoculation of containerized western conifer seedlings. *USDA Forest Service Re. Note*, PNW-357. 12pp.
- Oliet, J.A. 1998. La fertilización en el cultivo de los brinzales forestales. En: *Curso superior de viveros y producción de planta forestal autóctona para colonización de ecosistemas Mediterraneos*. Guadalajara.
- Parladé, J.; Alvarez, I.F. y Pera, J. 1996. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza* 6: 51-54.
- Pawuk, W.H., Ruehle, J.L. y Marx, D.H. 1980. Fungicides drenches affect ectomycorrhizal development on container grown *Pinus palustris* seedlings. *Can. J. Forest Res.* , 10: 61-64
- Peñuelas, J. L. y Ocaña, L. 1996. *Cultivos de la planta en contenedor: Principios y fundamentos*. Mundi-Prensa. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Peñuelas, J. 1998. Aspectos teóricos-prácticos de los sustratos de cultivo. En: *Curso superior de viveros y producción de planta forestal autóctona para colonización de ecosistemas Mediterraneos*. Guadalajara.
- Peñuelas, J. 1999. La calidad de la planta forestal. Calidad morfológica, fisiológica y genética. Normas de calidad. Control de calidad. En: *I Curso Básico de Viveros y Producción de Planta Forestal*. Guadalajara.
- Trappe, J.M., Molina, R. y Castellano, M. 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22: 231-259
- Trofymow, J. A. y van den Driessche, R. 1991. Mycorrhizas. En: *Mineral nutrition of conifer seedlings*. R. van den Driessche (ed.). CRC Press. pp 183-227.
- Väre, H. 1989. Effect of nitrogen on the growth of *Suillus variegatus* and on mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Aquilo. Ser. Bot.* 26: 19-24.
- Villar, P.; Ocaña, L.; Peñuelas, J. y Carrasco, I. 1999. Effect of water stress conditioning on the water relations, root growth capacity, and the nitrogen and non-structural carbohydrate concentration of *Pinus halepensis* Mill. (Alepo pine) seedlings. *Ann. For. Sci.* 56: 459-465.
- Wallander, H. 1992. *Regulation of ectomycorrhizal symbiosis in Pinus sylvestris L. seedlings. Influence of mineral nutrition*. Department of Forest Mycology and Pathology. Uppsala.
- Wallander, H. 1994. A new hypothesis to explain allocation of dry matter between mycorrhizal fungi and pine seedlings in relation to nutrient supply. *Plant Soil* 168: 243-248.
- Wilkund, K., Nilsson, L.O. y Jacobsson, S. 1995. Effects of irrigation, fertilization and artificial drought on basidioma production in a Norway spruce stand. *Can.J.Bot.* 73(2):200-208.