UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCOLA POLITÉCNICA SUPERIOR

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEXETAL

RESPUESTA DE SIETE ORÍGENES IBÉRICOS DE *PINUS PINASTER* AITON FRENTE A LA INOCULACIÓN EN VIVERO CON *PISOLITHUS TINCTORIUS* Y *PAXILLUS INVOLUTUS*

TESIS DOCTORAL

SANTIAGO LAMOSA QUINTEIRO

INGENIERO AGRÓNOMO

DIRECTORES:

Dra. Mª ISABEL IGLESIAS DÍAZ

Dr. FRANCISCO FERNÁNDEZ DE ANA-MAGÁN

Lugo, Enero de 2005

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCOLA POLITÉCNICA SUPERIOR

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEXETAL

RESPUESTA DE SIETE ORÍGENES IBÉRICOS DE *PINUS PINASTER* AITON FRENTE A LA INOCULACIÓN EN VIVERO CON *PISOLITHUS TINCTORIUS* Y *PAXILLUS INVOLUTUS*

TESIS DOCTORAL

SANTIAGO LAMOSA QUINTEIRO

INGENIERO AGRÓNOMO

Lugo, Enero de 2005

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

TESIS DOCTORAL

RESPUESTA DE SIETE ORÍGENES IBÉRICOS DE *PINUS PINASTER* AITON FRENTE A LA INOCULACIÓN EN VIVERO CON *PISOLITHUS TINCTORIUS* Y *PAXILLUS INVOLUTUS*

Memoria presentada para obtener el Grado de Doctor por Santiago Lamosa Quinteiro

VºBº. Directores de Tesis

Fdo. Mª Isabel Iglesias Díaz Fdo. Francisco Fernández de Ana-Magán

Lugo, Enero de 2005

Mª ISABEL IGLESIAS DÍAZ, PROFESORA E INVESTIGADORA DE LA ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LUGO DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Y FRANCISCO FERNÁNDEZ DE ANA-MAGÁN, PROFESOR DE LA ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LUGO DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA E INVESTIGADOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AMBIENTALES DE LOURIZÁN,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada **"Respuesta de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton frente a la inoculación en vivero con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*"**, que para optar al grado de Doctor presenta el Ingeniero Agrónomo **Santiago Lamosa Quinteiro** ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Producción Vegetal de la Escuela Politécnica de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, y en el Centro de Investigaciones Forestales y Ambientales de Lourizán.

Que consideran que representa un trabajo de Tesis y autorizan su presentación en el Departamento de Producción Vegetal de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, expiden el presente certificado en Lugo, a 19 de febrero de 2005

AGRADECIMIENTOS

No puedo presentar este trabajo sin mencionar a todas las personas que de algún modo han contribuido a su realización. A todas ellas quiero agradecer su colaboración.

El primer recuerdo es para mis directores, Mª Isabel Iglesias Díaz y Francisco Fernández de Ana-Magán, los artífices de la idea y las personas que han estado continuamente a mi lado ofreciéndome todo el apoyo y la ayuda necesaria. No quiero olvidarme de Antonio Rodríguez Fernández, quien me introdujo en el mundo de la micología, sin él saberlo, y de las micorrizas y el primer ideólogo del trabajo que hoy se presenta.

Deseo agradecer al Institut de Recerca i Tecnología Agroalimentaries de Cataluña (I.R.T.A.) y, en especial, a Xavier Parladé la cesión de algunas de las cepas utilizadas en este trabajo. A José Manuel Docampo, por su amistad y por suministrarme las semillas de "pino femia" necesarias para los ensayos. Al Centro de Investigacións Forestais e Ambientais de Lourizán (C.I.F.A.L.), en particular a la sección de Fitopatoloxía del departamento de Producción Vexetal, por permitirme trabajar en sus instalaciones, y por la ayuda de todo su personal: Pepe, Mª Carmen, María y Marina. A la Universidad de Santiago de Compostela por la cesión de sus instalaciones. A la Xunta de Galicia, por la financiación a través del Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica. Deseo agradecer, también, profundamente, la ayuda facilitada por Viveros Forestales Mañente, a la familia Candia y a todo su personal, que en todo momento me trataron como una más de la familia. Tengo que nombrar una vez más a Mª Isabel Iglesias, esta vez por su ayuda en los estudios estadísticos y en su interpretación y, por supuesto, por haber estado continuamente a mi lado.

Quiero acordarme de todos mis compañeros y amigos que, aunque no han colaborado directamente en la elaboración del trabajo, sí tuvieron que soportar buena parte de su peso aguantando mi presencia, o mi ausencia, en muchos momentos y animándome en otros. Gracias a Chus, Martín, Benjamín, Carmen y Sara, Juan, Nuria, Ángel, Iria, Carlos, Miguel, Merche, Julio, Mª Carmen, Orti, Tere, Nusky, César, Jose, Suso, Cristina, Marcial, Alfredo y Ana, Sali, Pablo, Carlos y Bea, Clara, Laura, Ana y, a la madrina, Toña.

Para finalizar, quiero dedicar a mis padres y hermanos este trabajo y agradecerles que estuvieran ahí.

Índice

INDICE GENERAL

1. Justificación y objetivos ……..…… 3

2. Antecedentes ……..……. 7

2.1. Pinus pinaster Ait. …….. 7

2.1.1. Descripción ……...…… 7

2.1.2. Taxonomía ……...…… 8

2.1.3. Distribución geográfica y natural ……...…… 10

2.1.4. Características agroecológicas ……...…..…… 11

2.1.5. Importancia ecológica ……...…..……. 13

2.1.6. Proceso de germinación y desarrollo de las plántulas ……..…… 15

2.1.7. Producción de plantas de *Pinus pinaster* en vivero ……..…… 19

2.1.7.1. Producción comercial de *Pinus pinaster* a raíz desnuda ……...…. 19

2.1.7.2. Producción comercial de *Pinus pinaster* en contenedor ……..... 20

2.1.8. Aprovechamiento forestal …… 22

2.1.9. Flora micológica del *Pinus pinaster* ……..... 24

2.1.10. Regiones de procedencia de *Pinus pinaster* en España……..... 27

2.1.10.1. Región de procedencia Noroeste (1) …….. 29

2.1.10.2. Región de procedencia Sierra de Oña (3) …….. 32

2.1.10.3. Región de procedencia Sierra de Gredos (6) ……. 33

2.1.10.4. Región de procedencia Meseta Castellana (8) ……...… 34

2.1.10.5. Región de procedencia Serranía de Cuenca (12) ……... 36

2.1.10.6. Región de procedencia Sierras de Segura-Alcaraz (17) ……. 36

2.1.10.7. Región de procedencia Sierra Bermeja (20) ……..… 37

2.2. Las micorrizas ……..….. 39

2.2.1. Definición de las micorrizas …… 39

2.2.2. Tipos de micorrizas …….. 40

2.2.2.1. Micorrizas arbusculares …… 40

2.2.2.2. Ectomicorrizas ……...… 41

2.2.2.3. Ectendomicorrizas …… 42

2.2.2.4. Ericoides ……... 42

2.2.2.5. Arbutoides …….. 42

2.2.2.6. Monotropoides ……... 42

2.2.3. Las ectomicorrizas ……...… 43

2.2.3.1. Funciones de las ectomicorrizas ……..... 43

2.2.3.1.1. Absorción de agua y nutrientes ……..…… 43

2.2.3.1.2. Producción de sustancias reguladoras de crecimiento ..….. 44

2.2.3.1.3. Protección contra ataques de hongos patógenos del suelo ... 44

2.2.3.2. Aplicaciones prácticas de las ectomicorrizas …… 44

2.2.3.3. Manejo de las ectomicorrizas ……. 46

2.2.3.3.1. Selección de hongos ectomicorrícicos …… 46

2.2.3.3.1.1. *Pisolithus tinctorius* ……..… 47

2.2.3.3.1.2. *Paxillus involutus* ……..… 50

2.2.3.3.1.3. *Laccaria laccata* …… 51

2.2.3.3.1.4. *Boletus badius* …… 51

2.2.3.3.2. Aislamiento y cultivo de hongos ectomicorrícicos ……..… 52

2.3. Literatura científica ……..…….. 54

3. Material y métodos ……. 61

3.1. Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro* …… 61

3.1.1. Especies y cepas seleccionadas ……...… 61

3.1.2. Medios de cultivo y pH ……...… 62

3.1.3. Diseño experimental y análisis estadístico ……..…… 64

3.1.4. Descripción del ensayo …… 64

3.1.5. Control de los ensayos …… 65

3.2. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton sembrados en suelo e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* …… 67

3.2.1. Orígenes de *Pinus pinaster* ensayados ……..… 67

3.2.2. Elección de las cepas/especies ectomicorrícicas ……..… 68

3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico ……..… 68

3.2.4. Localización y duración del ensayo ……..… 69

3.2.5. Características climáticas de la zona del ensayo ……..…… 69

3.2.6. Condiciones climáticas durante el periodo de ensayo ……..… 71

3.2.7. Características edafológicas de la parcela de ensayo ……..… 72

3.2.8. Preparación del inóculo ……...…… 72

3.2.9. Preparación del terreno y siembra ……... 73

3.2.10. Control de los ensayos ……..….. 74

3.2.11. Análisis de laboratorio ……..….. 75

3.3. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en contenedor utilizando técnicas convencionales de propagación de planta forestal e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* ……..….. 77

3.3.1. Orígenes de *Pinus pinaster* ensayados ……..…….. 77

3.3.2. Elección de las cepas/especies ectomicorrícicas ……..…… 77

3.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico ……..…… 77

3.3.4. Localización y duración del ensayo …… 78

3.3.5. Características climáticas de la zona del ensayo ……..… 79

3.3.6. Condiciones climáticas durante el periodo de ensayo ……..…… 79

3.3.7. Preparación del inóculo …… 81

3.3.8. Preparación para la siembra ……..…… 81

3.3.9. Inoculación ……... 83

3.3.10. Control del ensayo ……...… 84

3.3.11. Análisis de laboratorio ……..…… 85

4. Resultados ……..….. 89

4.1. Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro* …… 89

4.1.1. Morfología y crecimiento de las colonias …… 89

4.1.1.1. *Boletus badius* (Sarria) ……... 89

4.1.1.1.1. *Boletus badius* (Sarria) en MMN …….. 89

4.1.1.1.2. *Boletus badius* (Sarria) en Raper …….. 90

4.1.1.1.3. *Boletus badius* (Sarria) en agar-malta 4% …… 90

4.1.1.1.4. *Boletus badius* (Sarria) en PDA …… 92

4.1.1.1.5. Crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) …… 93

4.1.1.2. *Boletus badius* (San Vicente do Mar) ……..…… 98

4.1.1.2.1. *Boletus badius* (San Vicente) en MMN …… 98

4.1.1.2.2. *Boletus badius* (San Vicente) en Raper …… 99

4.1.1.2.3. *Boletus badius* (San Vicente) en agar-malta 4% ..…… 100

4.1.1.2.4. *Boletus badius* (San Vicente) en PDA ……..…… 101

4.1.1.2.5. Crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) ……..… 101

4.1.1.3. *Paxillus involutus* ……..... 102

4.1.1.3.1. *Paxillus involutus* en MMN ……..…… 102

4.1.1.3.2. *Paxillus involutus* en Raper ……..…… 102

4.1.1.3.3. *Paxillus involutus* en agar-malta 4% …… 107

4.1.1.3.4. *Paxillus involutus* en PDA …… 108

4.1.1.3.5. Crecimiento de *Paxillus involutus* ……. 109

4.1.1.4. *Laccaria laccata* ……..…… 109

4.1.1.4.1. *Laccaria laccata* en MMN ……..…. 109

4.1.1.4.2. *Laccaria laccata* en Raper ……..… 115

4.1.1.4.3. *Laccaria laccata* en agar-malta 4% ……..… 115

4.1.1.4.4. *Laccaria laccata* en PDA ……..… 116

4.1.1.4.5. Crecimiento de *Laccaria laccata* ……..…… 117

4.1.1.5. *Pisolithus tinctorius* ……..…… 117

4.1.1.5.1. *Pisolithus tinctorius* en MMN ……...… 117

4.1.1.5.2. *Pisolithus tinctorius* en Raper …… 122

4.1.1.5.3. *Pisolithus tinctorius* en agar-malta 4 % …….…… 122

4.1.1.5.4. *Pisolithus tinctorius* en PDA ……..…… 123

4.1.1.5.5. Crecimiento de *Pisolithus tinctorius* ……...… 123

4.2. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en suelo e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* ……... 131

4.2.1. Peso seco de la parte aérea …….. 131

4.2.2. Longitud de la parte aérea ……... 131

4.2.3. Relación entre la longitud y el peso seco de la parte aérea …….. 131

4.2.4. Porcentaje de supervivencia …….. 132

4.2.5. Porcentaje de ápices micorrizados ……..…… 132

4.2.5.1. Morfotipo L1 ……..…… 134

4.2.5.1.1. Morfología …… 134

4.2.5.1.2. Presencia ……..…… 134

4.2.5.2. Morfotipo L2 …… 135

4.2.5.2.1. Morfología ……... 135

4.2.5.2.2. Presencia ……..… 135

4.2.5.3. Morfotipo L14 ……..……..… 136

4.2.5.3.1. Morfología …… 136

4.2.5.3.2. Presencia ……..…… 137

4.2.5.4. Morfotipo LN …… 138

4.2.5.4.1. Morfología …… 138

4.2.5.4.2. Presencia ……...…… 139

4.2.6. Relación entre porcentaje de ápices micorrizados y desarrollo de la parte aérea ……...…… 139

4.3. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton sembrados en contenedor utilizando técnicas convencionales de propagación de planta forestal e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* ……. 142

4.3.1. Germinación …… 142

4.3.2. Variación del crecimiento a lo largo del ensayo ……..… 144

4.3.2.1. Crecimiento por orígenes ……...… 144

4.3.2.2. Crecimiento por inóculos ……..…… 145

4.3.2.3. Crecimiento de la región de procedencia Sierra Bermeja …….. 147

4.3.2.4. Crecimiento de la región de procedencia Serranía de Cuenca ….. 149

4.3.2.5. Crecimiento de la región de procedencia Noroeste, "pino femia" . 150

4.3.2.6. Crecimiento de la región de procedencia Sierra de Gredos …...… 151

4.3.2.7. Crecimiento de la región de procedencia Meseta Castellana…...… 153

4.3.2.8. Crecimiento de la región de procedencia Sierra de Oña …… 154

4.3.2.9. Crecimiento de la región de procedencia Segura-Alcaraz ….…… 155

4.3.3. Estado sanitario ……... 157

4.3.4. Evaluación de la micorrización y del crecimiento al final del ensayo … 157

4.3.5. Análisis de los resultados por procedencias …… 157

4.3.5.1. Región de procedencia Sierra Bermeja ……...… 157

4.3.5.2. Región de procedencia Serranía de Cuenca ……...… 159

4.3.5.3. Región de procedencia Noroeste, "pino femia" …… 159

4.3.5.4. Región de procedencia Sierra de Gredos ……..…… 160

4.3.5.5. Región de procedencia Meseta Castellana …… 160

4.3.5.6. Región de procedencia Sierra de Oña ……... 160

4.3.5.7. Región de procedencia Sierras de Segura-Alcaraz …… 160

4.3.6. Análisis de los resultados por inóculos …… 161

4.3.6.1. Controles sin inocular ……..... 161

4.3.6.2. Plantas inoculadas con *Paxillus involutus* ……..…… 163

4.3.6.3. Plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius* ……..… 165

4.3.7. Descripción de los morfotipos encontrados …… 166

4.3.7.1. Morfotipo F1 ……..…..… 166

4.3.7.1.1. Morfología …… 166

4.3.7.1.2. Presencia ……..…… 168

4.3.7.2. Morfotipo F5 …….. 168

4.3.7.2.1. Morfología …… 168

4.3.7.2.2. Presencia ……..…… 168

4.3.7.3. Morfotipo FN …… 168

4.3.7.3.1. Morfología …… 168

4.3.7.3.2. Presencia ……..…… 170

4.3.7.4. Relación entre porcentaje de micorrización y tamaño de la parte aérea …….. 170

5. Discusión ……...….. 175

5.1. Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro* ……..… 175

5.2. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en suelo e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* ….……177

5.3. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en contenedor utilizando técnicas convencionales de propagación de planta forestal e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* ……. 180

6. Conclusiones ……...…… 193

7. Bibliografía …….. 199

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Distribución de *Pinus pinaster* Ait. en su área natural ……..…… 11

Fig. 2. Climograma de Carballiño-Ourense. Región de procedencia Noroeste …… 29

Fig. 3. Regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. ……...…… 28

Fig. 4. Climograma de Oña …….. 32

Fig. 5. Climograma de Arenas de San Pedro. Región de procedencia Sierra de Gredos . 33

Fig. 6. Climograma de Aranda de Duero. Región de procedencia Meseta Castellana …. 34

Fig. 7. Climograma Villalba de la Sierra. Región de procedencia Serranía de Cuenca ... 36

Fig. 8. Climograma de Riopar. Región de procedencia Segura-Alcaraz …….. 37

Fig. 9. Climograma de Sierra Bermeja ……. 37

Fig. 10. Distribución de las publicaciones científicas sobre *Pinus pinaster* Ait. clasificadas por temáticas generales (desde 1908 a 2004) ……..… 57

Fig. 11. Diagrama de Gaussen de Lourizán-Pontevedra …….. 70

Fig. 12. Variación de las temperaturas en la parcela durante el periodo de ensayo (desde el 9 de noviembre de 2003 al 5 de julio de 2004) ……...……71

Fig. 13. Variación de la precipitación en la parcela durante el periodo de ensayo (desde el 9 de noviembre de 2003 al 5 de julio de 2004) …….. 71

Fig. 14. Variación de la temperatura media, máxima y mínima, diaria y mensual, en el interior del invernadero desde el 2 de abril al 9 de junio de 2004 …… 80

Fig. 15. Variación de la temperatura media, máxima y mínima, diaria y mensual, en el exterior (Observatorio de Pedro Muruais, Ribadeo) desde el 9 de junio hasta el 26 de agosto de 2004 …… 80

Fig. 16. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo MMN ……..…… 96

Fig 17. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo Raper ……..…… 96

Fig. 18. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo agar-malta 4% ……..…… 97

Fig. 19. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo PDA ……...… 97

Fig. 20. Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) ……...…… 98

Fig. 21. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo MMN …….. 105

Fig. 22. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo Raper ……..…… 105

Fig. 23. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo agar-malta 4% ……... 106

Fig. 24. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo PDA ……..... 106

Fig. 25. Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) ……. 107

Fig. 26. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo MMN ……. 112

Fig. 27. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo Raper ……. 112

Fig. 28. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo agar-malta 4% …….. 113

Fig. 29. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo PDA …….. 113

Fig. 30. Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* …. 114

Fig. 31. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo MMN ……. 120

Fig. 32. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo Raper ……..120

Fig. 33. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo agar-malta 4% ……..… 121

Fig. 34. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata*

en medio de cultivo PDA ……... 121

Fig. 35. Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* …… 122

Fig. 36. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo MMN ……. 126

Fig. 37. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo Raper ……..126

Fig. 38. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo agar-malta 4% ……..…… 127

Fig. 39. Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo PDA ……..….. 127

Fig. 40. Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* ... 128

Fig. 41. Modelos de regresión para las distintas procedencias de *Pinus pinaster* (porcentaje micorrización / peso seco parte aérea) …… 140

Fig. 42. Modelos de regresión para las distintas procedencias de *Pinus pinaster* (porcentaje micorrización / longitud parte aérea) …….. 141

Fig. 43. Evolución de la germinación de los 7 orígenes ensayados ……. 142

Fig. 44. Crecimientos quincenales de los 7 orígenes de *Pinus pinaster* Ait. ensayados durante todo el periodo de ensayo …… 146

Fig. 45. *Pinus pinaster* Ait. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control …… 147

Fig. 46. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Sierra Bermeja. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……148

Fig. 47. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Serranía de Cuenca. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……. 149

Fig. 48. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Noroeste (pino “femia”). Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……151

Fig. 49. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Sierra de Gredos.
Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de
Paxillus involutus, esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……152

Fig. 50. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Meseta Castellana.
Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de
Paxillus involutus, esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……..…….153

Fig. 51. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Sierra de Oña.
Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de
Paxillus involutus, esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……..…..155

Fig. 52. *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Segura-Alcaraz.
Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de
Paxillus involutus, esporas de *Pisolithus tinctorius* y control ……....156

Fig. 53. Modelos de regresión para las distintas procedencias de *P. pinaster*
(porcentaje micorrización/peso seco parte aérea) …….. 171

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Parte inferior del tronco de un ejemplar de *Pinus pinaster* de la Meseta Castellana, aprovechado para la producción de resina …….. 22

Foto 2. Ejemplar de pino femia ……..… 30

Foto 3. Pinar en Arévalo, Región de procedencia Meseta Castellana …… 35

Foto 4. Corteza de un ejemplar de "pino femia" y de otro de la Meseta Castellana ….. 35

Foto 5. Placa 347 BcP5R6, *Boletus badius* (S. Vicente), en PDA a pH 5.0 con el eje de coordenadas y las marcas de crecimiento en cada una de las fechas de la toma de datos ……..… 66

Foto 6. Placa 429 PiM5.5A2, *Paxillus involutus*, en MMN a pH 5.5, muestra utilizada para la descripción morfológica, junto con la carta de colores (RHS) …….. 66

Foto 7. Inóculo de *Paxillus involutus* en medio de turba-vermiculita …… 73

Foto 8. Parcela de ensayo …… 73

Foto 9. Detalle de las plántulas de pino …….. 74

Foto 10. Extracción de las muestras ……. 75

Foto 11. Parcela de ensayo en el interior del invernadero …… 81

Foto 12. Ensayo listo para ser trasladado al exterior …… 82

Foto 13. Parcela de ensayo en el exterior ……. 82

Foto 14. Bandejas sembradas y etiquetadas, listas para ser llevadas a la cámara de cultivo ……84

Foto 15. *Boletus badius*, Sarria, en MMN a pH = 5.5, a los 60 días. Reverso y anverso . 90

Foto 16. *Boletus badius*, Sarria, a los 45 días ……... 91

Foto 17. *Boletus badius*, Sarria, en agar-malta, a pH = 4.5, a los 45 días ……...…… 92

Foto 18. *Boletus badius*, Sarria, en PDA, a los 45 días …… 93

Foto 19. *Boletus badius*, San Vicente, en MMN, a pH = 5.0, a los 60 días Reverso y anverso …….. 99

Foto 20. *Boletus badius*, San Vicente, en Raper, a pH = 6.5, a los 60 días. Reverso y anverso ……..…… 100

Foto 21. *Boletus badius*, San Vicente, en agar-malta, a pH = 5.0, a los 60 días ……. 100

Foto 22. *Boletus badius*, San Vicente, en PDA, a pH = 5.0, 5.5 y 6.0, a los 60 días Reverso y anverso ……..… 101

Foto 23. *Paxillus involutus*, a los 60 días …… 108

Foto 24. *Paxillus involutus*, en MMN, a pH = 6.0 y en Raper a pH = 7.5, a los 60 días .. 108

Foto 25. *Laccaria laccata*, en MMN, a los 30 días. pH = 5.0, 5.5 y 6.0 …….. 114

Foto 26. *Laccaria laccata*, en MMN, a los 60 días. pH = 5.0, 5.5 y 6.0, reverso y anverso ……115

Foto 27. *Laccaria laccata*, en Raper, a pH = 7.5, a los 60 días. Reverso y anverso …… 116

Foto 28. *Laccaria laccata*, en agar-malta, a pH = 5.0, a los 60 días. Reverso y anverso . 116

Foto 29. *Laccaria laccata*, en PDA, a pH = 6.0, a los 45 días. Reverso y anverso …….. 117

Foto 30. *Pisolithus tinctorius*, en Raper, a pH = 7.0, a los 60 días. Anverso ……..… 122

Foto 31. RHS COLOUR CHART, carta de colores utilizada en la descripción de las colonias ……130

Foto 32. Morfotipo L1. Micorriza en estado incipiente ……..…. 135

Foto 33. Morfotipo L1. Micorriza dicotómica …….. 135

Foto 34. Morfotipo L1. Cortes transversales de una micorriza (1) ……... 135

Foto 35. Morfotipo L1. Cortes transversales de una micorriza (2) ……... 135

Foto 36. Morfotipo L2. Micorriza con rizomorfos (1) ……..… 136

Foto 37. Morfotipo L2. Micorriza con rizomorfos (2) ……..… 136

Foto 38. Morfotipo L2. Micorriza (1) ……..… 136

Foto 39. Morfotipo L2. Micorriza (1) 136

Foto 40. Morfotipo L2. Corte transversal de una micorriza apreciándose la red de Hartig y el manto ……. 136

Foto 41. Morfotipo L2. Rizomorfo ……..… 136

Foto 42. Morfotipo L14. Micorrizas (1) 137

Fotos 43. Morfotipo L14. Micorrizas (2) 137

Foto 44. Morfotipo L14. Corte longitudinal de una micorriza 137

Foto 45. Morfotipo L14. Corte transversal de una micorriza 137

Foto 46. Morfotipo L14. Manto externo plectenquimático en puzle …….....… 137

Foto 47. Morfotipo LN. Micorrizas (1) 138

Foto 48. Morfotipo LN. Micorrizas (2) 138

Foto 49. Morfotipo LN. Corte longitudinal de una micorriza 138

Foto 50. Morfotipo LN. Manto externo plectenquimático de forma radial 138

Foto 51. Morfotipo LN. Hifas de emanación ……138

Foto 52. Plántula de "pino femia" albina ……..144

Foto 53. Plántula de Sierra Bermeja, caracterizada por la dificultad de apertura de la semilla ……144

Foto 54. Plántula de Sierra Bermeja, daños ocasionados ……..144

Foto 55. Detalle de las plantas 45 días después de la siembra. Sierra Bermeja y Sierra de Oña ……..148

Foto 56. Morfotipo F1. Micorriza ……..... 167

Foto 57. Morfotipo F1. Micorriza ……..... 167

Foto 58. Morfotipo F1. Cistidios (1) ……167

Foto 59. Morfotipo F1. Cistidios (2) ……167

Foto 60. Morfotipo F1. Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto y la red de Hartig (1) …….. 167

Foto 61. Morfotipo F1. Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto y la red de Hartig (2) ……..…… 167

Foto 62. Morfotipo F1. Corte transversal una micorriza apreciándose el manto, la red de Hartig e hifas intercelulares ……167

Foto 63. Morfotipo F1. Hifas de emanación ……167

Foto 64. Morfotipo F5. Micorriza con rizomorfo (1) ……169

Foto 65. Morfotipo F5. Micorriza con rizomorfo (2) ……169

Foto 66. Morfotipo F5. Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto

y la red de Hartig (1) ……...… 169

Foto 67. Morfotipo F5. Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto y la red de Hartig (2) ……...… 169

Foto 68. Morfotipo F5. Corte transversal una micorriza apreciándose el manto, la red de Hartig e hifas intercelulares ……..169

Foto 69. Morfotipo F5. Rizomorfo ……...…….169

Foto 70. Morfotipo F5. Hifas ……...……. 169

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla resumen de las características de los distintos orígenes de *Pinus pinaster* ……..38

Tabla 2. Características de las especies/cepas utilizadas ……..… 61

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados en el ensayo ……...63

Tabla 4. Combinación de pH y medios de cultivo ensayados ……...… 63

Tabla 5. Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado en el ensayo de medios de cultivo y pH en laboratorio ……... 64

Tabla 6. Características de las semillas ensayadas …… 68

Tabla 7. Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado en el ensayo de orígenes (procedencias) en suelo ……69

Tabla 8. Tabla resumen de los datos climáticos de Lourizán de un periodo de 30 años ……70

Tabla 9. Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado para los porcentajes de germinación en el ensayo de orígenes (procedencias) en contenedor …….. 78

Tabla 10. Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado para los incrementos quincenales de la altura en el ensayo de orígenes (procedencias) en contenedor …….. 78

Tabla 11. Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado para los datos finales en el ensayo de orígenes (procedencias) en contenedor …… 78

Tabla 12. Tabla resumen de los datos climáticos de Benquerencia de un periodo de 10 años ……79

Tabla 13. Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (Sarria) para los diferentes medios de cultivo ……..94

Tabla 14. Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (Sarria) ……95

Tabla 15. Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (San Vicente) para los diferentes medios de cultivo …….. 103

Tabla 16. Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (San Vicente) ……..104

Tabla 17. Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Paxillus involutus* para los diferentes medios de cultivo ……..110

Tabla 18. Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Paxillus involutus* ……...….111

Tabla 19. Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Laccaria laccata* para los diferentes medios de cultivo ……..118

Tabla 20. Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Laccaria laccata* ……. 119

Tabla 21. Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Pisolithus tinctorius* para los diferentes medios de cultivo …….…….124

Tabla 22. Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Pisolithus tinctorius* ……...…. 125

Tabla 23. Tabla resumen de las descripciones morfológicas …….. 129

Tabla 24. Influencia del tipo de inóculo y de la procedencia de las semillas de *P. pinaster* sobre el peso seco de la parte aérea, longitud de la parte aérea, relación entre longitud y peso seco de la parte aérea, supervivencia, porcentaje de micorrización total, porcentaje del micotipo L1, porcentaje del micotipo L2, porcentaje del micotipo L14 y porcentaje del micotipo LN ……..…….…. 133

Tabla 25. Velocidad de germinación de las semillas ……. 143

Tabla 26. Influencia del origen de la semilla sobre la germinación …….…….. 143

Tabla 27. Influencia de las procedencias sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* cultivadas en contenedor …… 145

Tabla 28. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* cultivadas en contenedor ……... 147

Tabla 29. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantasde *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Sierra Bermeja, cultivadas en contenedor ……..… 149

Tabla 30. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Serranía de Cuenca, cultivadas en contenedor …….. 150

Tabla 31. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Noroeste "pino femia", cultivadas en contenedor …. 151

Tabla 32. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Sierra de Gredos, cultivadas en contenedor …….. 152

Tabla 33. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Meseta Castellana, cultivadas en contenedor ……154

Tabla 34. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Sierra de Oña, cultivadas en contenedor ……..…..155

Tabla 35. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Segura-Alcaraz, cultivadas en contenedor …… 156

Tabla 36. Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster*, en función del origen de la semilla …… 158

Tabla 37. Influencia del origen de las semillas sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster*, en función del inóculo utilizado …….162

1. Justificación y objetivos

1. Justificación y objetivos

Pinus pinaster Ait. es una especie forestal que se extiende de forma natural por las regiones costeras europeas y africanas del Mediterráneo occidental, llegando al litoral atlántico de Portugal, España y Francia. Es una especie de gran importancia en la Península Ibérica desde el punto de vista ecológico y forestal, y en particular en la comunidad gallega donde posee una superficie de 383.632 ha de masas puras y 231.178 ha de masas mixtas, con casi 200 millones de pies que representan un volumen maderable con corteza de prácticamente 50 millones de metros cúbicos (Villanueva *et al.*, 2002).

Se reconocen en la actualidad 20 regiones de procedencia y 7 procedencias de área restringida en España que agrupan masas de *Pinus pinaster* en función de las condiciones ecológicas de la zona y de sus características fenotípicas o genéticas. Además, dentro de la región de procedencia Noroeste, en el suroeste de Galicia, existe una considerable población de ejemplares de *Pinus pinaster* denominados tradicionalmente "pino o piñeiro femia", con unas características particulares que los distinguen perfectamente del resto de las poblaciones y que les confieren una excelente calidad desde el punto de vista forestal.

En la Comunidad Gallega existe un gran número de viveros forestales que han conseguido mejorar algunos aspectos técnicos del proceso productivo, como tipo de envase, sustrato, dosis de fertilización o control de las condiciones ambientales. A pesar de ello, quedan todavía muchos aspectos técnicos por mejorar. En la actualidad existe un consenso general sobre los beneficios que la simbiosis ectomicorrícica produce en la mayor parte de las plantas leñosas, en particular en los árboles forestales, y sobre la necesidad de producir planta forestal inoculada para aumentar la productividad de nuestros bosques. Sin embargo, todavía es necesario realizar un gran esfuerzo en investigación básica y aplicada con el fin de conocer los hongos asociados a esta especie, desarrollar protocolos para optimizar la producción de inóculo en grandes cantidades, mejorar el sistema de selección de hongos y los métodos de inoculación, etc. La introducción de una fase de inoculación ectomicorrícica dentro de las operaciones normales de producción comercial de *Pinus pinaster* en vivero podría influir de forma directa en la calidad final del producto.

Estudios realizados con *Pseudotsuga menziesii* (Wright y Ching, 1962) y *Betula pendula* (Last *et al.*, 1984), revelaron que la síntesis micorrícica depende también del origen de la planta. Este hecho puede influir de manera decisiva en la adaptación de ciertos orígenes fuera de su zona natural o fuera de las áreas de afinidad micorrícica y podría ser una de las

razones que explicaran la dificultad de adaptación de ciertos orígenes de *Pinus pinaster* fuera de sus regiones de procedencia. Hasta el momento, todos lo trabajos que han abordado el estudio de las características diferenciadoras de *Pinus pinaster* de las distintas regiones de procedencia de la Península Ibérica, lo han hecho desde el punto de vista morfológico, genético, productivo, de adaptación a condiciones climáticas, edáficas u otras características peculiares de cada zona, etc. Sin embargo, no se han efectuado estudios comparativos del comportamiento de diferentes orígenes de *Pinus pinaster* en las primeras fases de producción en vivero y del efecto de la inoculación micorrícica, lo que aportaría nuevos conocimientos sobre las características peculiares de esta especie y sobre su posibilidad de micorrización en vivero.

Tras esta breve justificación, los objetivos del presente trabajo son:

- Establecer las condiciones adecuadas de cultivo *in vitro* de varias cepas de hongos ectomicorrícicos interesantes por su compatibilidad con *Pinus pinaster* con objeto de optimizar la producción de inóculo vegetativo.
- Comparar el comportamiento durante los primeros meses de cultivo de siete procedencias ibéricas de *Pinus pinaster* sembradas en campo en Galicia e inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus* e inóculo esporal de *Pisolithus tinctorius*.
- Comparar el comportamiento durante los primeros meses de cultivo de siete procedencias ibéricas de *Pinus pinaster* en la fase de producción en Galicia mediante técnicas convencionales de multiplicación de planta forestal en contenedor e inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus* e inóculo esporal de *Pisolithus tinctorius*.

2. Antecedentes

2. Antecedentes

2.1. Pinus pinaster Ait.

2.1.1. Descripción

Pinus pinaster Ait. es un árbol muy común en buena parte del territorio español. Se le conoce por diversos nombres: pino negral, pino negrillo, pino rodeno, pino rodezno, pino borde, pino resinero, pino rubial, pino bravo, pino gallego.

Es un árbol de talla mediana, no suele pasar de 20 m, aunque a veces alcanza los 40 m en terrenos sueltos y frescos. El porte es regular. La copa es de forma cónica, densa en la juventud y más redondeada y clara en la edad adulta en que se reduce al tercio superior de la altura del árbol. En las razas del sur de España, la copa de los pies viejos adopta una forma aparasolada o acampanada y vacía en el interior, mientras que en las del Centro y Noroeste es irregularmente lobulada y más recogida. Las ramas son horizontales y regularmente verticiladas hasta edad avanzada. La corteza es gruesa y muy fisurada, gris negruzca y áspera en la juventud, luego pardo rojiza, separada por surcos también rojizos (Ceballos y Ruiz de la Torre, 2001).

Las acículas están envainadas en grupos de dos y son rígidas, gruesas y largas, las mayores de los pinos españoles (2-2,5 mm de grueso x 10-27 cm de largo), de color verde intenso, acanaladas o aplanadas en la cara interna, finamente aserradas en los bordes, con ápice pinchudo y de color verde oscuro vivo. Permanecen en el árbol durante tres o cuatro años.

Los brotes son rojizos, a veces con tinte carmín o rosado al desarrollarse. Las yemas, no resinosas, son ovoideas o subcilíndricas, terminadas en punta corta, blanquecino-peludas, franjeadas de blanco, libres y revueltas en sus extremos.

El sistema radical es el más fuerte de los pinos españoles, consta de una raíz principal penetrante y otras secundarias muy desarrolladas.

Florece a partir del séptimo u octavo año. Los conos floríferos femeninos son verticilados en grupos de 2 ó 3, rara vez aislados, erectos, pedunculados, de 20-22 cm de largo, son de color rojo y están situados en el extremo del brote terminal de las ramas superiores. Las flores masculinas, de 1-2 cm de largo y 4-6 mm de grueso, son amarillentas, muy numerosas, agrupadas en espigas de 6-7 cm y 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, sentadas o subsentadas, rojizas y brillantes, con los escudetes prominentes y agudamente carenados. Los piñones, oblongos, de 5 a 9 mm de longitud y de cubierta poco dura, presentan una de las caras de color negro lustroso y la otra gris. El ala es 3 ó 5 veces más larga que la semilla, de color marrón y estriada con bandas negras longitudinales.

Florece de fin de marzo a principios de mayo. Puede brotar en varias ocasiones durante la misma temporada de crecimiento (policiclismo). La piña está madura al final del verano del año siguiente, pero la dehiscencia y la caída de los piñones no tienen lugar hasta la primavera o verano del tercer año.

2.1.2. Taxonomía

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

Sinonimia: *P. maritima* Mill., nom. ambiguum = Subfam. Pinoideae, *P. glomerata* Salisb. = *P. escarena* Risso = *P. lemoniana* Benth. = *P. hamiltonii* Ten.

Presenta una gran variabilidad intraespecífica debido a la fragmentación de su área natural. Fieschi y Gaussen (1932), utilizando como criterio taxonómico el número de canales resiníferos presentes bajo la vaina, separaron la especie en dos: *Pinus maritima* Miller, para el tipo atlántico, caracterizado por dos canales resiníferos, y *Pinus mesogeensis* Fieschi et Gaussen, para el tipo mediterráneo, con más de dos canales resiníferos. Sin embargo, tanto la escasa entidad de este carácter (Huguet del Villar, 1933), como la gran variabilidad encontrada (March, 1939; Pinto da Silva, 1947) no permitieron mantener esta separación.

Otros autores (Tutin y Heiwood, 1964; Mirov, 1967) han aceptado la existencia de dos subespecies: una mediterránea, *P. pinaster* Ait. subesp. *pinaster* (*P. mesogeensis* F. et Gaussen), con acículas de 18 a 25 cm y piñas de 14 a 22 cm de longitud, que se extiende por el este y oeste de la región mediterránea; y otra atlántica, *P. pinaster* Ait. subesp. *atlantica* E. H. del Villar, con acículas de 10 a 20 cm y piñas de 9 a 18 cm de longitud, distribuída en la costa atlántica de Portugal, España y Francia. Sin embargo, los caracteres distintivos señalados no se mantienen constantes ni siquiera en sus áreas de origen, y las diferencias entre ambas podrían ser debidas a alteraciones provocadas por el cultivo de la planta mediterránea en regiones atlánticas, por lo que se admitiría una variedad cultivada: *Pinus pinaster* cv. Atlantica (Franco, 1986).

Estudios más recientes (Baradat, 1986) han llevado a establecer y diferenciar cinco razas geográficas principales:

- raza geográfica Maghreb, a la que pertenecen poblaciones de Marruecos, Argelia y Túnez
- raza geográfica Mediterránea Occidental, que ocupa el Sur y el Este de la península Ibérica, Var (Sureste de Francia), Alpes marítimos e Italia
- raza geográfica Corsa, en la isla de Córcega
- raza geográfica Ibérica del Noroeste, en Portugal, Galicia, Asturias y Norte de Castilla
- raza geográfica Landesa, representada por las masas de Aquitania

Los estudios realizados utilizando los terpenos presentes en las semillas como marcadores bioquímicos (Baradat y Marpeau, 1988 cit. Alía y Moro, 1996), han permitido diferenciar tres grandes grupos de poblaciones, que engloban a 18 razas geográficas elementales, cinco de las cuales se encuentran en España (Castilla, Galicia, Este y Sureste de España, Montes Cantábricos y Sierra de Ronda). Los tres grupos mencionados son los siguientes:

- grupo Atlántico, que incluiría las razas geográficas Landesa e Ibérica del Noroeste, englobando poblaciones de Las Landas en Francia, Leiría y Tras os Montes en Portugal, Tabuyo (León), La Bureba (Burgos), Galicia, Meseta Castellana y Sierra de Gredos
- grupo Maghrebí, que comprendería la raza geográfica del Maghreb, Marruecos excepto Punta Cires, Argelia y Túnez, y las poblaciones del sur de la Península Ibérica, Sierra Bermeja y la isla de Pantellaria
- grupo Perimediterráneo o Mediterráneo Europeo, a la que pertenecerían la raza geográfica Corsa y el resto de las poblaciones españolas y del sudeste de Francia, las razas continentales italianas, Cerdeña, Córcega y Punta Cires en Marruecos

Esta distribución geográfica se refleja también en otros caracteres morfológicos (Resch, 1974), en la producción y calidad de fustes (Rycroft y Wicht, 1947; Sweet y Thulin, 1962; Molina, 1965; Matziris, 1982; Alía *et al.*, 1991; Danjon, 1994; Alía *et al.*, 1995; Alía y Moro, 1996), en la adaptación al frío y a la sequía (Bouvarel, 1960; Illy, 1966; Guyon y Kremer, 1982; Nguyen y Lamant, 1989; Fernández, 1996), en la resistencia a plagas

(Schvester, 1982; Harfouche *et al.*, 1995 a, b) y en la variación de sistemas enzimáticos (Petit, 1988).

2.1.3. Distribución geográfica y natural

P. pinaster se extiende de forma natural por las regiones costeras, europeas y africanas del Mediterráneo occidental, llegando al litoral atlántico de Portugal, España y Francia (Fig. 1), aunque actualmente se ha extendido a otros países de la Unión Europea, como Bélgica, Dinamarca y Grecia (Matziris, 1982), y por varios continentes por medio de repoblaciones, como Australia (Nicholls *et al.*, 1963), California (Rehder, 1940), Nueva Zelanda (Sweet y Thulin, 1962) y Sudáfrica (Duff, 1928; Rycroft y Wicht, 1947).

Las especulaciones sobre el carácter autóctono de las representaciones actuales de *P. pinaster* han originado múltiples polémicas. Rikly (1943) y más tarde Destremau *et al.* (1982), sitúan el centro de diseminación de la especie en "un sector de montañas medias de la Península Ibérica en la confluencia de las corrientes climáticas mediterránea y atlántica". Teixeira (1944) considera que *P. pinaster* se habría diferenciado del *P. praepinaster* Teix., encontrado en el Plioceno de Río Maior en Portugal, y que se habría refugiado durante la glaciación würmiense en el norte de Africa o en el Algarve, desplazándose posteriormente hacia el norte y alcanzando su distribución actual. Baradat y Marpeau (1988), estudiando la composición terpénica de las poblaciones, señalan que éstas quedaron reducidas a un pequeño número de individuos situados en la misma área geográfica, y localizan en la sierra de Ronda y en el norte de África el refugio de esta especie durante el Würm III (35.000 años). Gil *et al*. (1990), considerando la distribución actual de la especie y los estudios realizados por Alía (Alía, 1989 cit. Alía *et al.*, 1996), en los que evaluó el comportamiento de 52 orígenes de *P. pinaster* en parcelas en el centro de España, sitúan en la Serranía de Cuenca el núcleo fundamental de la especie, a partir del cual se derivaron los distintos grupos o razas en que se encuentra diferenciada. Salvador *et al.* (1996) confirmarían este refugio en la parte sur del Sistema Ibérico mediante análisis de isoenzimas.

A pesar de estas discusiones sobre el origen o sobre el carácter autóctono de *P. pinaster*, sí se puede afirmar que su distribución espontánea actual se sitúa en territorios altamente humanizados desde antiguo, lo cual influyó sustancialmente en la conformación final del paisaje vegetal, tanto mediante la realización de repoblaciones, fuera y dentro de su área de distribución primitiva, como mediante talas, roturaciones, fuego y/o pastoreo, originando la distribución actual de *P. pinaster*, discontinua y fragmentada. En todo caso, se

debería aceptar que más de la mitad de los pinares españoles actuales son manifestaciones antiguas (Gil *et al.*, 1990).

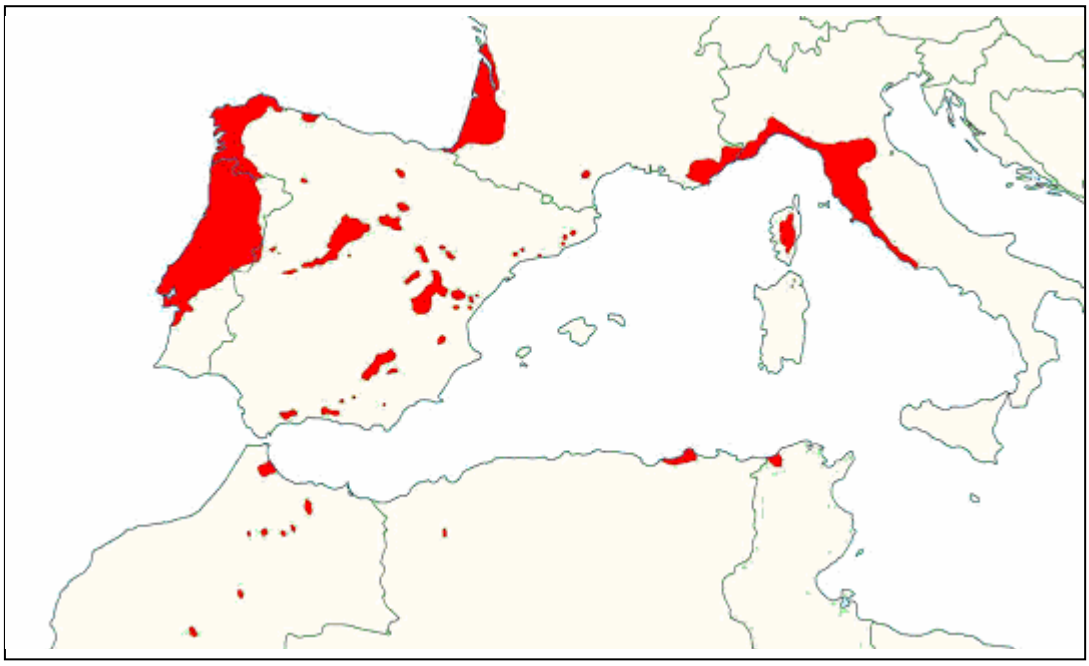


Fig. 1.- Distribución de *Pinus pinaster* Ait. en su área natural (Alía y Martín, 2003)

2.1.4. Características agroecológicas

Los pinos, en general, son árboles frugales, xerófilos, de carácter pionero en la progresión vegetal, heliófilos, de temperamento robusto e invasor, sencillos de manejar en vivero y de fácil implantación y pervivencia. Respecto al *P. pinaster* en particular, una de las características más sobresalientes es su tolerancia a suelos con escasa fertilidad y poco evolucionados y aunque abunda en suelos bien drenados, también soporta suelos escasamente drenados como ocurre en Las Landas, o en los suelos arcillosos de la Serranía de Ronda (Nicolás y Gandullo, 1967). Como buen representante de los pinos, es una especie pionera o colonizadora de espacios vacíos, ocupando las primeras etapas de la sucesión hacia formaciones más complejas, debido a su reducido nivel de exigencia y a su facilidad de adaptación a las variaciones de suelo y clima. Estas escasas exigencias y la rapidez con que se desarrolla le permiten colonizar suelos desnudos, donde aún no han podido instalarse otras especies. Por este motivo, se ha utilizado, ofreciendo buenos resultados, para la fijación de dunas, la protección del suelo frente a la erosión (Moore, 1988) y la recuperación de zonas forestales (de Braganca y Havel, 1987). Por otro lado, necesita para su desarrollo la ausencia de cubierta arbórea, debido al carácter heliófilo de sus plántulas, por lo que 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. Además, ha desarrollado una gran proporción de corteza, una fructificación precoz y un gran reservorio de semillas, almacenadas en las piñas cerradas de las copas con el fin de adaptarse al fuego. Sus semillas tienen un gran poder de diseminación, germinando perfectamente sobre un suelo quemado y aventajando al resto de la vegetación debido a su rápido crecimiento.

A pesar de que se le considera una especie de suelos arenosos y ácidos, y por tanto calcífuga, también se le puede encontrar en suelos muy arcillosos e incluso suelos muy calcáreos como en las montañas iberolevantinas y en las de las cordilleras béticas (Ceballos, 1933; Hughet del Villar, 1933; Nicolás y Gandullo, 1967). Sin embargo, crece mejor en suelos arenosos que en limosos o arcillosos debido a que la fracción horizontal de su sistema radical se desarrolla mucho mejor en suelos fácilmente penetrables. La fracción vertical, en cambio, 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). Aunque prefiere suelos ricos, ligeros y profundos (Schafer, 1988), con una buena disponibilidad de agua, una de las características más importantes de este pino es su tolerancia a los suelos poco fértiles, 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.

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 los vegetales (Maugè, 1987), tal como sucede en las dunas de Aquitania (Chaperon, 1986) en las que viven sobre suelos con trazas de elementos nutritivos. A pesar de su gran frugalidad, responde de forma notable a la fertilización (Bonneau *et al*., 1973; Gelpe y Guinadeau, 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).

El comportamiento de la especie en conjunto frente a los distintos factores climáticos está profundamente influenciado por la constitución genética del individuo y varía notablemente según la procedencia, por lo que resulta difícil generalizar sus características. De los 20 fitoclimas establecidos por Allué Andrade (1990) en el territorio español, en 9 nos encontramos manifestaciones relativamente importantes de *P. pinaster*, y no aparece en condiciones áridas o subáridas. 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 periodos 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 sólo afectan a las hojas, sino también al cambium y al sistema radical, por lo que los síntomas pueden manifestarse más tarde, cuando el árbol ya ha 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 periodo de frío extremo.

A nivel general, *P. pinaster* es poco sensible a la cantidad y a1 reparto de la pluviometría, aunque se observan diferencias entre procedencias. Así, las procedencias de Las Landas y del Noroeste de la Peninsula 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). Ello se debe a que las razas meridionales poseen una menor tasa de transpiración, además de una protección cerosa en sus acículas y una mayor proporción de biomasa radical. Pero, a pesar de estas adaptaciones, el crecimiento se ve muy afectado si no dispone de una cantidad suficiente de agua y de nutrientes en disolución durante los periodos de vegetación activa. Esto es debido a que las plantas reaccionan a la baja humedad ambiental, que suele acompañar a los periodos estivales, cerrando sus estomas (Loustau y Moussa, 1989), consiguiendo una reducción del consumo de agua pero bloqueando, a la vez, 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.

2.1.5. Importancia ecológica

Respecto a la idoneidad de *P. pinaster* en el medio natural español, las opiniones son divergentes. Gil *et al.* (1990), intentando conciliar posturas, opinan que "se deben abandonar opiniones simplistas, como la aceptación global de la especie o su aceptación incondicional". Habría que valorar las virtudes y limitaciones de la especie y emplearla en aquellas zonas en que su implantación pueda ser útil, desde el punto de vista ecológico y/o productivo, sin ocasionar una regresión en las etapas evolutivas del suelo.

Las mayores críticas del *P. pinaster*, se han basado en:

- ser una especie introducida en muchos de sus enclaves ibéricos (Taborda de Morais, 1940; Bellot y Viéitez, 1945; Hopfner, 1954; Costa, 1974; Rivas

Martínez, 1975; Sánchez Mata, 1986) y procedente de repoblaciones antiguas (Costa, 1974; Bellot *et al.*, 1983; Izco, 1984; Peinado y Martínez, 1985; Navarro y Valle, 1987)

- favorecer los incendios forestales (Sanz Fernández, 1986; Costa, 1988; Sánchez Mata y Fernández González, 1989)
- dudosa viabilidad biológica de su cultivo ya que su utilización es siempre regresiva desde el punto de vista ecológico (Alvarado, 1983; Rivas Martínez, 1987)
- acción negativa sobre la evolución del suelo (Velasco y López Martínez, 1973; Velasco, 1975; Izco, 1984; Sánchez Mata y Fernández González, 1989)

Debido a las características propias de los pinos, que poseen una gran capacidad de resistir el frío y las sequías pero tienen una escasa capacidad de competencia, bajo las copas de un pinar adulto, principalmente aquellas razas de copa amplia que impiden la iluminación del sotobosque, no existen plantas jóvenes ya que se ahilan ante la falta de luz y acaban desapareciendo, impidiendo su regeneración e iniciando, así, la evolución hacia formaciones más diversificadas. Las frondosas, en cambio, si existe suficiente profundidad de suelo, se desarrollan a la sombra de los pinos a la espera de la muerte de los ejemplares más viejos, ocupando el dosel arbóreo y dando lugar a una etapa umbrógena e higrófila, de mayor densidad y resistencia a los incendios, quedando los pinos relegados a las situaciones más difíciles: aquellas zonas donde la precipitación, el sustrato o el relieve resultan limitantes a las frondosas para volver a extenderse cuando el fuego deja lugares vacíos (Gil *et al.*, 1990).

Sánchez Mata y Fernández González (1989), comentan que para evitar la desertización o la erosión de los suelos, se deben reimplantar las especies arbóreas de los bosques autóctonos dado que están mejor adaptadas ecológica y evolutivamente para ello, por lo que, en la actualidad, el uso de las frondosas sería una alternativa deseable a la de los pinos. En cambio Gil *et al.* (1990), afirman que utilizar frondosas en las repoblaciones sería una estrategia suicida, tal como lo denomina Laguna (1988) en términos de ecología general, pues conlleva para la especie costes energéticos muy elevados a cambio de logros muy reducidos.

Los pinos en general son especies frugales, poco exigentes en cuanto a humedad edáfica y ambiental, con un potente sistema radical que ejerce una acción mecánica favorable sobre suelos poco evolucionados. Son especies capaces de iniciar la creación del suelo y protegerlo, deteniendo su degradación, pero incapaces de mejorarlo en la misma medida que lo hacen las frondosas (Gil *et al.*, 1990). Conviene añadir, además, que el carácter xerófilo del

P. pinaster le confiere una mayor probabilidad de arder que otras formaciones más nemorales e higrófilas, sin embargo, es precisamente esta característica la que le permite soportar las condiciones de alta iluminación y la pobreza de los suelos degradados. Blanco (1986) afirma que es un hecho probado que la instalación de *P. pinaster* supone una reducción notable de la tasa erosiva de los suelos en que vegeta, debido a la fragilidad textural (suelos excesivamente arenosos) y estructural (debido al bajo contenido de arcilla y humus) de esos suelos, siempre que la repoblación se efectúe sobre suelos desnudos o escasamente poblados y por medios no traumáticos. Este hecho pone de manifiesto la idoneidad del *P. pinaster* para la repoblación de suelos degradados, pero en ningún caso para sustituír formaciones más evolucionadas. Incidiendo en este aspecto, Braun Blanquet (1964) subralla el papel favorecedor que representa *P. pinaster* en la regeneración del robledal climácico en Portugal.

Como opinión contraria, cabe señalar la postura de Rivas Martínez (1987) que considera el uso del *P. pinaster* inadecuado o regresivo para su empleo en repoblaciones en toda su área española y pone de manifiesto la dudosa viabilidad de esta especie para un gran número de pinares actuales, a pesar de que existen numerosas zonas con buenos pinares espontáneos como Cuéllar (Segovia), Bayubas (Soria), Villanueva de Gubiel (Burgos), Almodóvar y Poyatos (Cuenca), Benicasim (Castellón), Moratalla (Murcia), Paterna del Madera (Albacete) y Sierra Bermeja (Málaga) (Gil *et al.*, 1990).

2.1.6. Proceso de germinación y desarrollo de las plántulas

El proceso de la germinación consiste en el reinicio del crecimiento del embrión y su desarrollo en una plántula independiente.

Las semillas de la gran mayoría de las especies de pinos germinan normalmente durante la primavera del año siguiente a su dispersión (McLemore, 1959), aunque existen especies cuyas semillas no germinan hasta el segundo o tercer año.

El fenómeno de la germinación comienza poco tiempo después de que la semilla haya absorbido agua a través del micropilo. El primer indicio de la germinación se manifiesta con la ruptura de la testa cerca del extremo micropilar. Esta ruptura es causada en primer lugar por la presión de imbibición de agua y posteriormente por el crecimiento del embrión.

A medida que el embrión inicia su crecimiento, la radícula es la primera en emerger de la semilla. En los pinos la germinación es epigea, es decir, los cotiledones se desarrollan sobre la superficie del suelo debido a la elongación del hipocótilo. Los procesos bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar durante la germinación han sido ampliamente tratados por

Toole *et al.* (1956), Koller *et al.* (1962), Mayer y Shain (1974), McDonough (McDonough, 1977 cit. Niembro, 1986).

En ocasiones se producen anomalías como germinación invertida, en la cual los cotiledones emergen antes que la radícula; formación de plántulas albinas, débiles o mucilaginosas; ruptura de la testa sin la emergencia del embrión (Kozlowski, 1971; Pollock y Ross, 1972). Por lo general estos tipos de germinación producen plántulas que morirán poco tiempo después de haber germinado.

A medida que transcurre la germinación, las reservas alimenticias contenidas en las células del gametofito femenino, van siendo asimiladas por el embrión en el curso de su crecimiento y desarrollo. La germinación llega a su término cuando el embrión se ha convertido en una plántula independiente con facultad para sintetizar su propio alimento (Kozlowski, 1971).

El tiempo requerido por las semillas de *Pinus* para germinar varía de acuerdo con la especie, aunque en términos generales la germinación se completa en el curso de 12 a 30 días. En concreto, las semillas de *Pinus pinaster* germinan lentamente y sobre todo poco homogéneamente si no se les somete a tratamientos previos. Incluso se ha comprobado que tanto la capacidad como la energía germinativa varía en el mismo lote en el curso de un año (Catalán, 1991).

Los factores ambientales que mayor influencia ejercen en la germinación en condiciones naturales son la humedad, la temperatura, la luz, el oxígeno y las características del suelo (Niembro, 1986).

La humedad contenida en el suelo es necesaria para hidratar los coloides gelificados contenidos en las células del embrión y del gametofito femenino. La cantidad de agua que requieren las semillas para germinar varía de acuerdo con la especie, pero en términos generales un suelo que tenga un 40 % de humedad es adecuado para que germine normalmente la mayoría de las semillas de pino (Baker, 1950).

Debido a que el proceso de germinación va acompañado de una intensa actividad metabólica, es necesario un suministro continuo de oxígeno. Con sustratos excesivamente húmedos las semillas por lo general no germinan a causa de la deficiencia de oxígeno (Baker, 1950).

La temperatura es uno de los factores más importantes que controlan la germinación de las semillas de los pinos (Fraser, 1970 cit. Niembro, 1986), ejerciendo también una notable

influencia en el crecimiento inicial de las plántulas. Todas las plantas tienen un intervalo de temperatura entre un máximo y un mínimo fuera del cual no germinan, entre ambas existe una temperatura óptima de germinación que varía entre las especies y entre las diferentes procedencias de la misma especie (Fraser, 1970). Los estudios de Kintigh (1949) demostraron que a medida que aumenta la temperatura del suelo se incrementa la actividad metabó1ica del embrión. Temperaturas por encima del óptimo ocasionan que las reservas del gametofito femenino sean consumidas con mayor rapidez y no sean debidamente asimiladas por el embrión, por lo que las plántulas resultantes son pequeñas y débiles. De igual manera, las bajas temperaturas reducen la actividad metabólica del embrión, por lo que al final de la germinación se encuentran porciones de tejido nutritivo sin ser utilizado.

Las características del sustrato también ejercen una notable influencia tanto en la germinación como en el posterior crecimiento y desarrollo de las plántulas. Básicamente, se debe a la posibilidad de transferir humedad a la semilla con facilidad, a las diferencias de temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes y a la penetrabilidad del suelo por parte de la radícula (Kozlowski, 1971).

El número de semillas de *Pinus pinaster* por kilogramo oscila entre 15.000 y 28.600. El tamaño de las semillas influye notablemente en su germinación y en el posterior desarrollo de las plántulas (Caballero, 1967). Las semillas grandes, superiores a la media de la población, presentan la tendencia a germinar con mayor rapidez y con mayor porcentaje que las semillas de mediano y pequeño tamaño.

Una vez que se ha producido la germinación, las plántulas presentan una consistencia frágil y quebradiza. En esta etapa inicial de desarrollo las plántulas carecen de estructuras especializadas así como de un sistema vascular completamente organizado.

En los pinos la germinación es precedida por el desarrollo secuencial de tres tipos de apéndices foliares: las hojas cotiledonares, las hojas primarias y las hojas secundarias (Kozlowski, 1971). Las hojas cotiledonares son las hojas del embrión y alcanzan su máximo desarrollo durante la germinación. En condiciones favorables, 2 ó 3 semanas después de la germinación, se manifiesta el crecimiento del epicótilo con el consiguiente desarrollo de las hojas primarias (Tepper, 1964). A medida que las hojas primarias inician su crecimiento y desarrollo, en las axilas de algunas de estas hojas se producen los meristemos que posteriormente darán origen a las hojas secundarias. A partir de este momento las diferencias en la morfología y la tasa de crecimiento y desarrollo de las plántulas de las diferentes especies de pinos comienza a ser evidente. Las hojas primarias crecen rápidamente, el

epicótilo se hace más resistente y la radícula incrementa su tamaño y desarrollo (Baker, 1950).

Las hojas primarias comprenden el tipo principal de hojas que tienen las plántulas durante la primera estación de crecimiento. Al iniciarse la segunda estación aparecen las hojas secundarias, mientras que las primarias se reducen a catafilos.

Las primeras etapas del desarrollo de las plántulas básicamente están constituidas por crecimiento primario. Antes de que finalice la primera estación de crecimiento se forma en la plántula el cambium vascular a partir de las células del procambium. Una vez constituido el cambium vascular comienza el crecimiento secundario o en diámetro que es el resultado de las divisiones de las células del cambium para producir xilema hacia el interior y floema hacia el exterior. A medida que la plántula incrementa en diámetro la epidermis va siendo reemplazada por la peridermis (Esau, 1965 cit. Niembro, 1986). Con la formación de la peridermis el hipocótilo adquiere una consistencia leñosa y resistente, finalizando así el estado suculento de la plántula, alcanzando una mayor resistencia a plagas y enfermedades, desecación, fuego, ataque de insectos, pastoreo, etc.

El fenómeno de la germinación descrito puede ser explicado y cuantificado desde diferentes puntos de vista, como pueden ser la capacidad germinativa, el coeficiente de nascencia, la energía de germinación, etc.

La capacidad germinativa se refiere al porcentaje de semillas de un lote determinado que dan lugar a plántulas normales en condiciones de laboratorio. El coeficiente de nascencia, es una medida semejante a la capacidad germinativa pero las semillas no se desarrollan en condiciones controladas de laboratorio sino en las condiciones normales de campo.

Un criterio especialmente interesante que nos permite caracterizar el proceso de germinación, es la energía germinativa que es una medida de la velocidad con la que las semillas germinan y puede ser expresada de varias maneras (Willan, 1991):

- porcentaje de semillas que germinan dentro de un periodo determinado en óptimas o determinadas condiciones, por ejemplo 7 ó 14 días
- el porcentaje de semillas germinadas hasta llegar al momento de germinación máxima, que normalmente viene dado como el número máximo de germinaciones en 24 horas
- el número de días preciso para que se alcance el 50 % de la capacidad de germinación (Allen, 1958)

La energía germinativa es un índice del vigor de las semillas y, desde un punto de vista práctico, tiene una importancia tan grande como la capacidad germinativa. Una semilla con una rápida germinación tendrá más oportunidades de eludir las adversidades ambientales que una semilla con una germinación más lenta o irregular, que podría tener consecuencias fatales (Aldhous, 1972).

2.1.7. Producción de plantas de *Pinus pinaster* en vivero

Hasta finales del siglo XIX o principios del XX, en el que comienzan a usarse envases prismáticos fabricados en barro o con lámina de corteza de chopo, la tipología de planta forestal utilizada en reforestación era a raíz desnuda. En la actualidad la práctica de esta modalidad de cultivo es muy escasa. Esta evolución, de la producción de planta a raíz desnuda a la producción de planta en contenedor, es lógica si pensamos en las condiciones climáticas y edafológicas normales del territorio español, como la escasa y/o gran variabilidad de la pluviometría, las fuertes evapotranspiraciones potenciales, la alta insolación, los suelos pocos profundos o la presencia de matorral heliófilo invasor que provoca fuertes competencias. Estas características del entorno, unidas a la utilización de una planta con su sistema radicular amputado que provocaba una sequía fisiológica temporal hasta que el sistema radical conseguía regenerarse, pone en evidencia la necesidad de la transformación sufrida en los métodos de producción de planta forestal hacia sistemas que produjesen un mínimo daño al sistema radical y que permitieran mantener una humedad localizada en el entorno de la planta.

2.1.7.1. Producción comercial de *Pinus pinaster* a raíz desnuda

Un aspecto importante en la producción de planta forestal de *P. pinaster* a raíz desnuda es la elección del emplazamiento del vivero (Morby, 1984) atendiendo a sus características climáticas, tipo de suelo, preferentemente ligero y bien drenado (Eavis, 1972; Davey, 1984; Warkentin, 1984), la topografía y la calidad del agua (ligeramente ácida) (Landis, 1982; Day, 1984).

Antes de la siembra se procede a la preparación del terreno, la eliminación de la vegetación existente, la fertilización de fondo según las necesidades del suelo y la preparación y desinfección de los bancales de siembra. La siembra suele realizarse a principios de primavera, a una densidad de 80-100 plantas/m^2. El control de malas hierbas puede realizarse mediante escarda química cuando las plantas están suficientemente desarrolladas (6-8 cm) utilizando herbicidas selectivos.

A finales de agosto las plantas suelen tener una altura suficiente (12-15 cm) para permitir el repicado mecánico de la raíz a 6 cm de profundidad y estimular la ramificación del sistema radical pudiendo repetir nuevamente esta operación a finales de septiembre en función del crecimiento de las plantas. A mediados de noviembre ya se podrían cosechar las plantas manteniendo en todo momento la integridad del sistema radical.

P. pinaster a raíz desnuda se ha utilizado con frecuencia aunque cada vez se usa menos dado los riesgos que conlleva en las condiciones climáticas actuales. A pesar de ello, puede ser una técnica de producción adecuada para determinadas circunstancias ya que permite obtener una buena calidad de planta en una solo periodo de crecimiento y a un precio bajo. Su uso ofrece buenos resultados siempre que las plantas posean 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).

2.1.7.2. Producción comercial de *Pinus pinaster* en contenedor

Las plantas producidas por este método son criadas y transportadas con sus raíces y cepellón dentro de un envase. La gran ventaja es que al no alterarse el sistema radical de la planta durante el transporte y la plantación, suele arraigar con mayor facilidad, aunque se encarece su transporte y distribución.

A pesar de las ventajas del cultivo en contenedor y de que las plantas ornamentales se han venido cultivando en envase desde épocas remotas, la utilización de este método en planta forestal es relativamente reciente, aunque hoy en día está prácticamente generalizado.

La producción de plantas en contenedor tiene ciertos puntos críticos que influyen decisivamente en la calidad final de la producción. En primer lugar, es importante la elección del contenedor con una forma y un diseño interior que evite la espiralización del sistema radical y con un volumen adaptado al nivel de desarrollo de la planta que se pretende producir (Ben Salem, 1971; Hiatt y Tinus, 1974).

El sustrato es otro punto fundamental para el buen desarrollo de la producción. Debe proporcionar a las plantas agua, aire, nutrientes y soporte físico. Debe ser un sustrato ligeramente ácido, de alta capacidad de intercambio catiónico, baja fertilidad intrínseca, alta capacidad de rehidratación y un adecuado equilibrio en el tamaño de los poros (Ruano, 2003). La mayoría de los sustratos modernos consisten en una mezcla de dos o más componentes orgánicos y/o inorgánicos combinados en distintas proporciones según las propiedades físicas y químicas buscadas. El material orgánico más utilizado actualmente en viveros forestales es

la turba de *Sphagnum*, rubia o negra, aunque se pueden utilizar otros muchos tipos, la mayoría subproductos de otros cultivos o actividades, como corteza de pino compostada, cáscara de arroz, serrín, virutas de madera, orujos, lodos de depuradora, etc. En la actualidad, la mayoría de los viveros utilizan una mezcla de turba rubia de *Sphagnum* y corteza de pino compostada, el material orgánico alternativo a la turba más prometedor. En cuanto a los materiales inorgánicos, tradicionalmente, los más utilizados en España son vermiculita y perlita.

El primer beneficio de la utilización de un sustrato no fértil, a diferencia con la producción de planta en tierra, es permitir al viverista aportar los nutrientes esenciales en las concentraciones, relación y momento adecuado. Los abonos más usados actualmente son los abonos solubles para aplicar en fertirrigación y los abonos de liberación lenta. Hoy en día hay disponibles en el mercado una gran variedad de formulaciones por lo que se hace relativamente fácil adaptarse a las necesidades de los cultivos en sus diferentes fases.

Otra ventaja de este método es el mejor estado sanitario de las plantas, debido a la facilidad de desinfección del sustrato y del control fitosanitario ya que, debido a la individualización de las plantas, se impide la rápida dispersión de los posibles agentes patógenos del suelo.

La zona de producción debe estar, además, dotada de un sistema de riego adecuado y un sistema de protección frente a la radiación solar directa, que provocaría problemas de evapotranspiración excesiva y calentamiento del sustrato.

Hoy en día, a pesar de que todos estos sistemas y procesos pueden mecanizarse y automatizarse, la producción en contenedor resulta más costosa que la producción a raíz desnuda. Sin embargo, tanto la mayor rapidez en la producción (Stein, 1974) como la buena calidad de la planta (Barnett, 1984), repercuten en una mayor supervivencia al trasplante y un mayor crecimiento durante los primeros años en campo (Tinus y Owston, 1984; Chaperon y Cailmail, 1988), más patente cuanto más desfavorables son las condiciones edafoclimáticas de la zona de plantación (Chaperon, 1986).

Esta técnica es una buena alternativa en climas como el nuestro, con campañas de plantación cortas, porque permite alargar la duración de estos periodos además de ser el único método posible en estaciones cálidas sin verdadera parada vegetativa. Resulta, también, adecuado cuando se usa material vegetal con un elevado nivel genético como semillas procedentes de huertos semilleros o cuando las características del vivero están lejos del óptimo, especialmente en cuanto al tipo de suelo.

2.1.8. Aprovechamiento forestal

El producto principal que se obtiene en la selvicultura actual de *Pinus pinaster* es la madera. Tiene duramen rojizo y albura blanco amarillenta, con una veta muy característica formada por anillos de crecimiento muy aparentes y un porcentaje de corteza, en general, muy elevado que oscila entre el 20 y el 40 % del volumen total. Los turnos de corta han ido variando con el tiempo. Actualmente se consideran turnos de 30 a 40 años, que aseguran unos diámetros en la corta final de entre 35 y 40 cm.

La madera es aplicable a casi todos los usos y sus características mecánicas son equivalentes a la de las otras resinosas. La razón de su mala reputación viene desde antiguo (Maugè, 1987), ya que hasta épocas muy recientes el principal producto obtenido de esta especie era la resina. Los árboles se mantenían en producción durante 80 años o más, mientras su resinación resultaba rentable. Cuando se talaban, para permitir la implantación de una nueva generación, los troncos presentaban fenómenos de putrefacción interna y los primeros metros estaban totalmente deformados por las heridas (Foto 1). Además se procedió a una selección negativa desde el punto de vista de la producción de madera ya que los árboles que no eran buenos productores de resina eran invariablemente eliminados en las primeras entresacas, sin tener en cuenta si se trataban de individuos rectos y vigorosos. Este fenómeno fue más intenso en las zonas especializadas en la producción de miera como la Meseta Castellana.

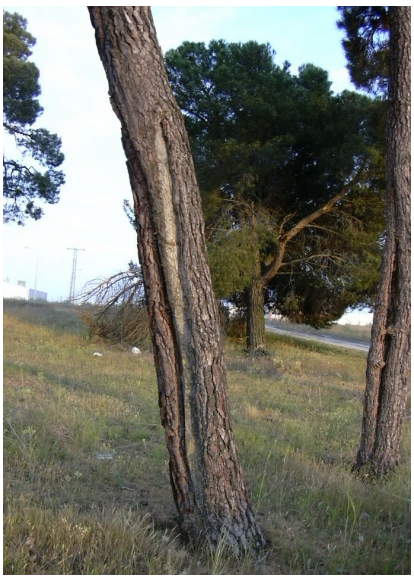


Foto 1.- Parte inferior del tronco de un ejemplar de *Pinus pinaster* en Arévalo (Región de Procedencia Meseta Castellana), aprovechado para la producción de resina.

En los últimos 50 años (Chaperon, 1986) se ha extendido espectacularmente los campos de aplicación de la madera de *P. pinaster*. Las maderas de mejor calidad, fustes rectos y nudosidad escasa, se han destinado a la industria del aserrado para maderaje de edificios y construcciones, parqués y molduras. La industria de tableros es otro consumidor importante, centrándose en la madera de escasa dimensión, cuyo precio es inferior. La madera de inferior calidad, nudosa, azulada o con otros defectos, tenía su principal salida en la producción de pasta para la industria papelera (Cailleau, 1984), aunque hoy en día se

suelen dirigir para astillado, utilizándose para la industria de la celulosa la madera de eucalipto principalmente.

La producción de resina fue durante mucho tiempo una de las principales actividades asociadas al *Pinus pinaster*. Su aprovechamiento comenzó en el siglo XIX y rápidamente se convirtió en uno de los productos forestales más importantes. La máxima producción en España se obtuvo en 1961 con 56.000 toneladas (Tadesse *et al.*, 1999). En los últimos 30 años esta producción se ha reducido drásticamente hasta llegar a las 9.000 Tm/año (Prada *et al.*, 1997). Actualmente la producción de resina se encuentra centrada principalmente en montes de la Meseta Castellana localizados en la provincia de Segovia, aunque existen otras localidades en las que todavía se mantiene alguna producción como Sotos y Almodóvar del Pinar en Cuenca (Jordán *et al.*, 2003).

Existen otras producciones secundarias, cada vez más en desuso, especialmente aprovechadas por las poblaciones rurales, como la producción de leña y piñas para combustible, el aprovechamiento del matorral para cama de ganado o el pastoreo una vez rozado éste. Estos aprovechamientos, habituales en otros tiempos y hoy prácticamente testimoniales, evitaban la acumulación de residuos y reducían al mínimo el riesgo de incendios.

Hoy en día uno de los productos procedentes del pino con mayor auje es la corteza de pino triturada, de diferente finura según su uso, destinada a producción de sustratos agrícolas, compost o acolchado en jardinería. Este producto debe estar previamente compostado y debidamente esterilizado, normalmente mediante autoclave, para evitar posibles perjuicios debido a la emisión de sustancias fenólicas que pueden afectar al desarrollo de las plantas, por la dispersión de semillas de malas hierbas o la transmisión de agentes patógenos.

Pero, quizá el aprovechamiento complementario más importante en la actualidad sea el aprovechamiento micológico, no sólo desde el punto de vista puramente productivo sino, y cada vez más importante, desde un aspecto socio-económico. Algunas áreas rurales comienzan a darse cuenta del enorme potencial que supone el aprovechamiento micológico como motor para una transformación de la actividad agraria tradicional y para la valorización del entorno, lo que supondría un crecimiento económico y diversificado de las zonas rurales con el consiguiente mantenimiento de la población rural e incluso la atracción de nuevos contingentes poblacionales (Molina y Estebaranz, 2004).

2.1.9. Flora micológica del *Pinus pinaster*

Las masas de *Pinus pinaster* forman un biotopo muy adecuado para la producción micológica. Estos hongos se pueden clasificar en parásitos, micorrícicos y saprófitos. Desde el punto de vista de su autoecología, las especies de hongos ectomicorrícicos se pueden dividir a su vez en cuatro grupos: exclusivas, frecuentes o raras en bosques de coníferas e indiferentes al tipo de bosque.

Castro (1985) cita un total de 367 especies fúngicas encontradas en bosques de *Pinus pinaster* en Galicia, de las cuales 106 eran especies micorrícicas, mientras que Fernández (1994) cita 124 taxones de especies micorrícicas encontradas en bosques de pinos en la Comarca de Pinares en Soria. A continuación se citan las 182 especies de hongos micorrícicos encontrados en estos tipos de bosques, 46 de los cuales fueron descritos en ambos estudios:[1]

Hongos micorrícicos exclusivos de bosques de coníferas:

- *Amanita submembranacea***
- *Boletus badio-rufus**
- *Boletus pinicola*
- *Cantharellus lutescens**
- *Cantharellus tubaeformis*
- *Chalciporus amarellus**
- *Chroogomphus rutilus*
- *Clavariadelphus truncatus***
- *Clitocybe clavipes***
- *Cortinarius biveloides**
- *Cortinarius claricolor**
- *Cortinarius duracinus**
- *Cortinarius hercynicus***
- *Cortinarius herpeticus***
- *Cortinarius malachius**
- *Cortinarius mucifluus***
- *Cortinarius mucosus***
- *Cortinarius odorifer***
- *Cortinarius percomium**
- *Cortinarius variecolor***
- *Cystoderma amianthinum*
- *Gomphidius glutinosus**
- *Gomphidius roseus**
- *Hebeloma strophosum**
- *Hebeloma truncatum***
- *Hydnum repandum*
- *Hygrophorus camarophyllus***
- *Hygrophorus colophyllus***
- *Hygrophorus hypothejus*
- *Laccaria bicolor***

[1] * taxones citados por Castro (1985) en Galicia
** taxones citados por Fernández (1994) en la Comarca de Pinares en Soria
sin marca: taxones citados por ambos autores

- *Lactarius badiosanguineus**
- *Lactarius deliciosus*
- *Lactarius hepaticus**
- *Lactarius mitissimus**
- *Lactarius quieticolor**
- *Lactarius rufus*
- *Lactarius sanguifluus**
- *Lactarius semisanguifluus**
- *Leucocortinarius bulbiger***
- *Pisolithus arhizus**
- *Rhizopogon luteolus***
- *Russula adusta***
- *Russula amethystina***
- *Russula caerulea**
- *Russula emetica**
- *Russula integra***
- *Russula mustelina***
- *Russula olivascens*
- *Russula queletii**
- *Russula rhodopoda**
- *Russula sanguinea***
- *Russula sardonia*
- *Russula torulosa*
- *Russula violacea**
- *Russula xerampelina***
- *Russuta turci*
- *Sarcodon glaucopus***
- *Sarcodon imbricatum*
- *Sarcodon leucopus***
- *Scleroderma polyrhizum**
- *Suillus bellini***
- *Suillus bovinus*
- *Suillus collinitus***
- *Suillus granulatus**
- *Suillus grevillei***
- *Suillus luteus*
- *Suillus variegatus***
- *Thelephora palmata***
- *Tricholoma apium***
- *Tricholoma colosum*
- *Tricholoma equestre*
- *Tricholoma focale***
- *Tricholoma fucatum**
- *Tricholoma josserandii*
- *Tricholoma luridum***
- *Tricholoma portentosum*
- *Tricholoma psammopus**
- *Tricholoma saponaceum*
- *Tricholoma sejunctum***
- *Tricholoma vaccinum**
- *Xerocomus badius*

Hongos micorrícicos frecuentes en bosques de coníferas:

- *Amanita spissa*
- *Amanita verna*
- *Boletus erythropus*
- *Hebeloma longicaudum**
- *Lactarius ichoratus*

Hongos micorrícicos raros en bosques de coníferas:

- *Boletus impolitus**
- *Hygrocybe quieta**
- *Lactarius chrysorheus*
- *Lactarius piperatus**

- *Lactarius subdulcis**
- *Russula cyanoxantha*
- *Tricholoma ustale**
- *Xerocomus subtomentosus*

Hongos micorrícicos indiferentes al tipo de bosque:

- *Amanita aspera*
- *Amanita boudieri**
- *Amanita citrina*
- *Amanita gemmata*
- *Amanita muscaria*
- *Amanita ovoidea**
- *Amanita pantherina*
- *Amanita phalloides*
- *Amanita porphyria***
- *Amanita rubescens*
- *Amanita vaginata***
- *Amanita valens*
- *Boletopsis leucomelaena***
- *Boletus calopus***
- *Boletus edulis*
- *Boletus luridus***
- *Boletus pulverulentus**
- *Camarophyllus niveus**
- *Cantharellus cibarius*
- *Cantharellus cinereus**
- *Chalciporus piperatus***
- *Clitopilus prunulus*
- *Cortinarius alboviolaceus**
- *Cortinarius cinnamomeoluteus***
- *Cortinarius elatior*
- *Cortinarius obtusus***
- *Cortinarius purpurascens***
- *Cortinarius subvalidus***
- *Cystoderma granulosum**
- *Geastrum vulgatum***
- *Gyroporus castaneus**
- *Hebeloma cistophyllum**
- *Hebeloma crustuliniforme***
- *Hebeloma edurum**
- *Hebeloma hiemale**
- *Hebeloma sinapizans***
- *Hydnum rufescens***
- *Hygrocybe coccinea**
- *Hygrocybe conica**
- *Hygrocybe insipida**
- *Hygrophorus chrysodon***
- *Hygrophorus gliocyclus***
- *Hygrotrama schulzeri**
- *Laccaria amethystina***
- *Laccaria laccata***
- *Lactarius aurantiacus**
- *Lactarius camphoratus***
- *Lactarius fuliginosus***
- *Lactarius quietus**
- *Lactarius theiogalus**
- *Lactarius vellereus***
- *Lactarius violascens**
- *Lactarius volemus***
- *Lycoperdon molle*
- *Lycoperdon perlatum*
- *Lycoperdon umbrinum*
- *Paxillus involutus* **
- *Rozites caperata***
- *Russula aeruginea***
- *Russula albonigra*
- *Russula amoena**
- *Russula atropurpurea***

- *Russula aurata***
- *Russula azurea***
- *Russula chloroides***
- *Russula cicatricata**
- *Russula delica***
- *Russula densifolia*
- *Russula fragilis***
- *Russula luteotacta**
- *Russula nigricans*
- *Russula ochroleuca***
- *Russula pumila**
- *Sarcodon scabrosus***
- *Scleroderma areolatum**
- *Scleroderma cepa***
- *Scleroderma citrinum**
- *Scleroderma meridionale**
- *Tricholoma columbeta***
- *Tricholoma flavobruneum***
- *Tricholoma imbricatum***
- *Tricholoma pardinum***
- *Tricholoma pseudonictitans***
- *Tricholoma sejunctum***
- *Tricholoma sulphureum***
- *Tricholoma terreum***
- *Tricholoma virgatum***
- *Tylopilus felleus***
- *Xerocomus chrysenteron*

La productividad de este micotopo a menudo se ve limitada por las condiciones de altitud y por la sequía, que reducen tanto la cantidad como la diversidad de las especies fúngicas presentes. A pesar de ello, la gran extensión de los pinares existentes en España hace de éstos unas de las áreas más importantes para la recogida de hongos comestibles (Fernández de Ana-Magán y Rodríguez, 2000).

2.1.10. Regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. en España

La elevada variabilidad genética, la gran diversidad ecológica y el aislamiento entre masas de *P. pinaster*, ha desembocado en la existencia de razas geográficas con morfologías, comportamientos (Sweet y Thulin, 1962; Molina, 1965; Alía *et al.*, 1995, 1996) y características genéticas diferentes. A partir de los resultados obtenidos por Alía *et al*. (1991), se ha comprobado que existe una interacción genotipo-ambiente para caracteres como la supervivencia o el crecimiento en altura. Estas características, unidas a las características geográficas, climáticas y edáficas de los pinares, han conducido a la delimitación de 20 regiones de procedencia (Fig. 3), definidas como un territorio o un conjunto de territorios sometidos a condiciones ecológicas prácticamente uniformes y en los que hay poblaciones de una determinada especie que presentan características fenotípicas o genéticas análogas (OM 21-1-89, BOE nº 33 del 8-2-1989), y 7 procedencias de área restringida, definidas por Díaz Fernández *et al.* (1995) como las manifestaciones de la especie en el interior de la Península,

acantonadas en pequeños enclaves ambientalmente favorables y alejadas del área principal de la especie.

La creación de regiones de procedencia ha sido fundamental para caracterizar comportamientos diferenciales de *P. pinaster*, como base para programas de mejora o de producción de semilla, para el mantenimiento de los recursos genéticos de la especie y para delimitar las zonas de utilización de semilla y evitar, así, resultados peores de los esperados.

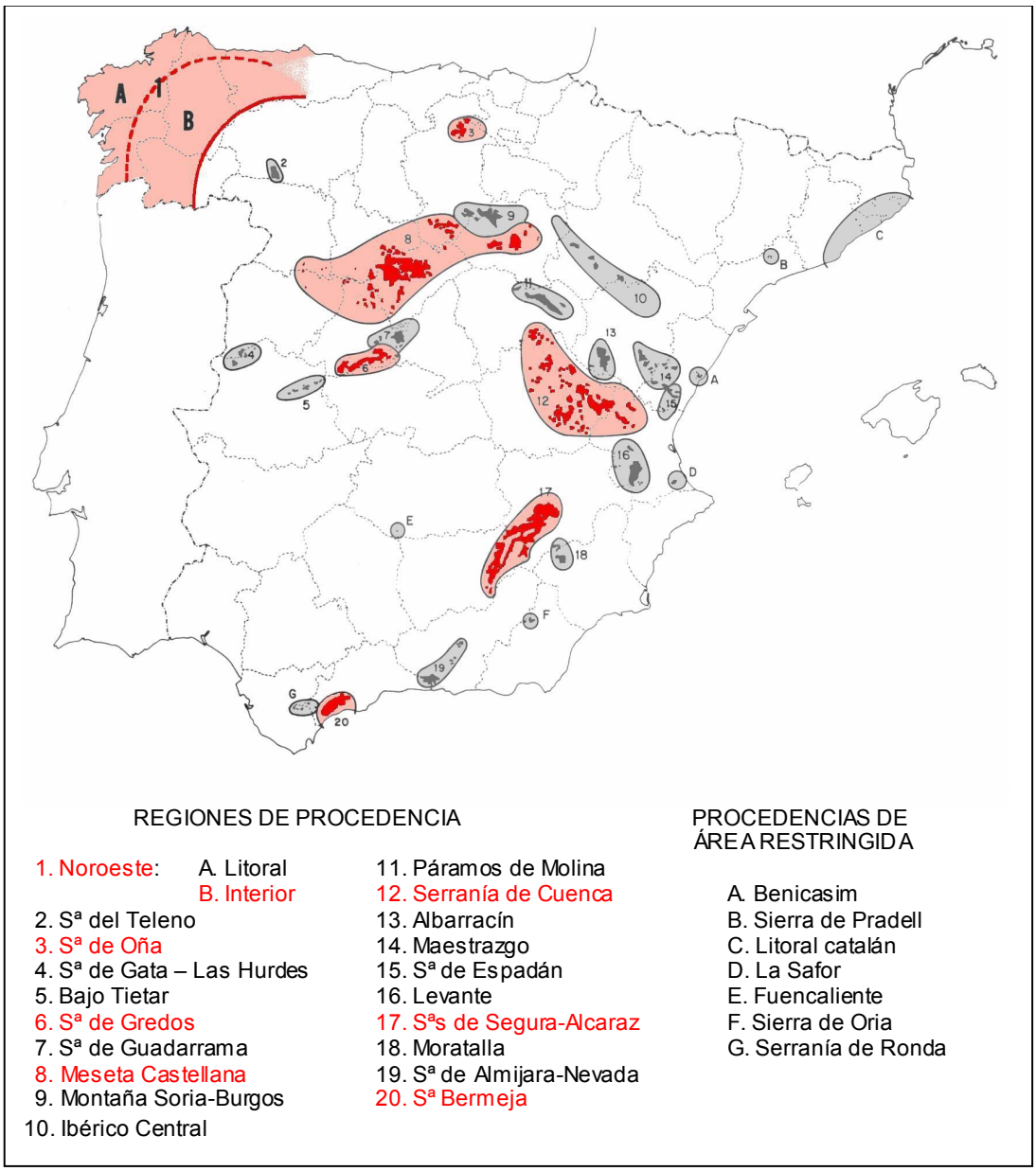


Fig. 3.- Regiones de procedencia de *Pinus pinaster* Ait. (Alía *et al*., 1996). En rojo las regiones de procedencia origen del material vegetal utilizado en el trabajo.

2.1.10.1. Región de procedencia Noroeste (1)

Esta región de procedencia se subdivide en dos regiones en función, fundamentalmente, de la altitud: la región costera (1a-Noroeste Litoral) que discurre desde el litoral hasta los 600 m de altitud (Toval, 1987) y la región interior (1b-Noroeste Interior) que se sitúa por encima de dicha cota. Posee unas 620.000 ha de masas puras y mezcladas en Galicia y 50.000 ha en Asturias (Xunta de Galicia, 2001).

La subregión Noroeste Costera incluye todo el litoral desde el río Miño, al sur, hasta la ribera occidental del río Aboño, próximo a Gijón, al norte, recorriendo las provincias de Pontevedra, A Coruña, Lugo y Asturias. El límite inferior se fija en la isohipsa de 600 metros que coincide con el piedemonte noroccidental de las Sierras del Macizo Galaico-Duriense y la Cordillera Cantábrica. Se extiende entre 5º35' y 9º15' longitud W, y 41º53' y 43º46' latitud N.

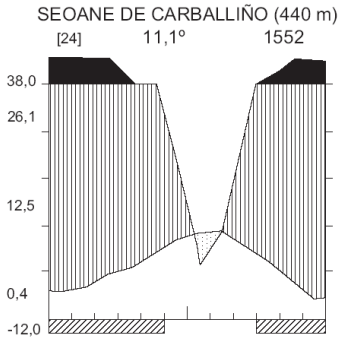
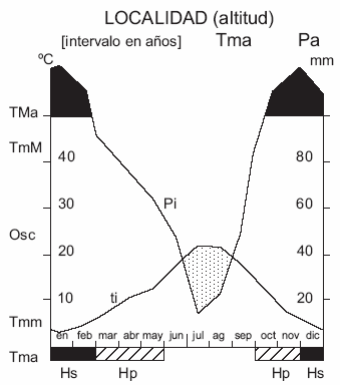


Figura 2. Climograma de Carballiño-Ourense. Región de procedencia Noroeste. (Allue Andrade, 1990)

El clima en esta subregión es muy favorable para el crecimiento del *P. pinaster* debido a las abundantes precipitaciones y a las temperaturas suaves, y corresponde a fitoclimas nemorales genuinos frescos y nemoromediterráneo subnemoral.

La geología esta conformada por rocas graníticas y sedimentos del Paleozoico Inferior muy consolidados, con litofacies de areniscas, cuarcitas y pizarras. En general son suelos de media a elevada evolución (cambisoles y luvisoles respectivamente), fuertemente ácidos, con texturas de francas a francoarenosas. Las mejores calidades se corresponden a las texturas más arenosas (Nicolás y Gandullo, 1967; Bara y Toval, 1983).

Clave del climodiagrama de Gaussen-Walter



Tma.- temperatura media anual
Pa.- precipitación anual
TMa.- temperatura máxima absoluta del periodo
TmM.- temperatura media de las máximas del mes de media más alta
Osc.- media anual de la oscilación térmica diaria
Tmm.- temperatura media de las mínimas del mes de media más baja
Tma.- temperatura mínima absoluta del periodo
Ti.- temperatura media de cada mes
Pi.- precipitación en cada mes
Hs.- meses de helada segura (Tmm ≤ 0ºC)
Hp.- meses de helada probable (Tmm > 0ºC y Tma ≤ ºC)

Esta subregión es la más importante debido tanto a su productividad como a la mejora de la especie, dado que se ha instalado un huerto semillero a partir de 128 árboles de esta zona y se han realizado ensayos de progenies.

Este pino destaca por su rápido crecimiento, con un turno de aprovechamiento de 30-40 años, con una productividad mayor que las obtenidas en Las Landas o Leiría. Desde el punto de vista morfológico es muy parecido al de Las Landas (Guinadeau, 1956) aunque con fustes más rectos en conjunto y con un crecimiento más rápido. Suele presentar copas pequeñas con ramas finas y ángulos muy agudos, lo que propicia la existencia de abundante vegetación de sotobosque, y se caracteriza por una fructificación menos abundante que otras poblaciones. La subregión Noroeste Interior se sitúa en las sierras interiores gallegas y los piedemontes más occidentales de la Cordillera Cantábrica, distribuyéndose a través de las provincias de Pontevedra, A Coruña, Lugo, Ourense, Asturias, Zamora y León.

En cuanto a la climatología corresponde al subtipo fitoclimático nemoromediterráneo genuino $VI(IV)_2$ y a nemoral genuino fresco tibio VI(V) con tendencia a subtipos más fríos y áridos, como nemoromediterráneo subnemoral $VI(IV)_3$ y mediterráneo genuino IV_4.

Las condiciones geológicas y edáficas son básicamente las mismas que las de la subregión litoral.

Respecto a la foraneidad del *Pinus pinaster* en Galicia ya, Laguna, en 1883 (cit. Alía *et al.*, 1996), apoyaba el origen antrópico de las masas existentes escribiendo que "es común en gran parte de Galicia, donde, sin embargo, no es, probablemente, espontáneo, sino procedente de siembras y plantaciones". Esta idea fue corroborada por Bellot y Viéitez (1945), quienes

Foto 2.- Ejemplar de pino femia en el Parque Natural del Monte Aloia en Tui (Pontevedra)

concluyeron que *Pinus pinaster* no era espontáneo en esta región, al no haberse encontrado polen de pino a profundidades inferiores a 20 cm en turberas más o menos localizadas hacia el interior.

En cuanto a su introducción en Galicia, Valdés y Gil (2002) aceptan el carácter autóctono del *Pinus pinaster*, y consideran que debió perdurar a lo largo de los siglos en forma de grupos o rodales más o menos aislados en suelos de baja calidad, sin que en ningún momento hubiese desaparecido por completo, y que en los últimos siglos se habrían extendido a partir de las pequeñas manchas que habrían sobrevivido. González Garcés (1987), en cambio, afirma que fue en la época medieval cuando "empezaron a poblarse de pinos grandes cantidades de terreno, pero solamente en las zonas costeras". Ruiz Zorrilla (1980) considera que fue durante el siglo XVIII cuando se generaliza este árbol, aunque admite que debió introducirse a finales del siglo XVII por la zona del Miño. Esta tesis es apoyada en parte por Calderón (1993) quien apunta hacia las reforestaciones efectuadas desde finales del siglo XVII. También Fernández de Ana-Magán (2001) afirma que el *Pinus pinaster* fue introducido en Galicia a finales del siglo XVII desde Val do Miño y las zonas costeras más meridionales y aporta documentos del Catastro de Ensenada de 1753 que constatan la presencia de esta especie en dichas zonas. Esta área inicial con presencia de *Pinus pinaster* habría aumentado debido a plantaciones hechas por los propietarios de montes particulares (1850), a partir de los cuales se habría extendido de forma natural por los montes vecinales colindantes (Jenaro, 1887 cit. Fernández de Ana, 2001). Su avance continuaría fundamentalmente por la zona costera asociado a la industria de la salazón, actividad muy demandante de este tipo de madera en aquella época. En cuanto al origen del material vegetal empleado, tal como recoge el mismo autor, el avance del *Pinus pinaster*, parece ser hecho con "semente do país" por lo que se estaría empleando una raza con buena adaptación al medio. Posteriormente, a partir de 1950, las repoblaciones hechas por el Patrimonio Forestal del Estado introducirían en Galicia nuevas razas de *Pinus pinaster* procedentes del interior de la península, que crearían problemas de adaptación al medio y producciones de menor calidad (Fernández de Ana-Magán, 2001).

El denominado "pino femia", es un calificativo propio utilizado en Galicia y que hace referencia a árboles sobresalientes, de excelente crecimiento y forma, con fustes rectos y corteza muy fina y lisa, que aparecen aislados o en bosquetes (Rodríguez Soalleiro *et al.*, 1997) (Fotos 2 y 4).

Los pinos de esta región se recomiendan para su uso en Galicia y zonas costeras con clima VI(V).

Baradat y Marpeau (1988) incluyen esta población dentro del grupo Atlántico, junto con las poblaciones de Portugal, Noroeste de España, Tabuyo, Oña y Castilla la Vieja, basándose en el estudio de terpenos.

2.1.10.2. Región de procedencia Sierra de Oña (3)

Esta región se sitúa hacia el norte de la provincia de Burgos, concretamente en la Depresión de La Bureba, con algunos rodales de pequeña extensión, inferiores a 5 hectáreas, en Álava y con ejemplares dispersos en la vertiente cantábrica hasta una altitud de 230 m en el Valle de Ayala, siendo el intervalo altitudinal entre 500 y 1.000 m. Es una procedencia aislada y de extensión reducida, unas 15.000 ha.

Fitoclimáticamente es una zona heterogénea, alternando el nemoromediterráneo genuino $VI(IV)_1$ y el $VI(IV)_2$.

Desde el punto de vista geológico, se encuentran diversas rocas madre que proporcionan suelos de características variadas (Nicolás y Gandullo, 1967), aunque la mayor parte de los pinares viven en suelos formados a partir de calizas y margas del Mesozoico, que poseen una textura arenosa y pH moderado o fuertemente básico. Los suelos son de evolución media con un horizonte cámbico que en función de la acumulación de carbonato cálcico forman calcisoles o cambisoles calcáreos.

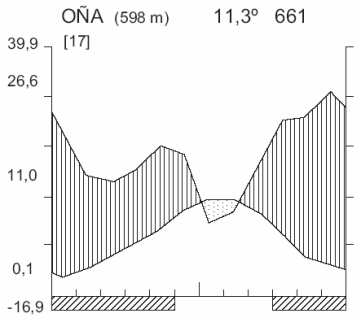


Fig. 4.- Climograma de Oña (Allué Andrade, 1990)

Estos árboles son poco rectos, de forma rechoncha, con acículas más rígidas que los procedentes de la región del Teleno (2) (Fig. 4), con un ángulo de inserción de las ramas de aproximadamente 90º y con un crecimiento lento (Guinadeau, 1956). En ensayos realizados en el centro de España (Baradat y Marpeau, 1988), esta procedencia destaca por su escaso crecimiento en altura, crecimiento medio en diámetro, copa amplia, fustes de muy baja calidad, con un gran porcentaje de pies demasiado torcidos, con una gran tendencia al policiclismo y con gran cantidad de piñas y de gran espesor.

Baradat y Marpeau (1988) incluyen esta población dentro del grupo Atlántico.

Es una procedencia de uso local únicamente.

2.1.10.3. Región de procedencia Sierra de Gredos (6)

Esta zona ocupa las laderas meridionales de la Sierra de Gredos, colonizando las laderas septentrionales en su extremo meridional (Sierra del Valle) y llegando hasta la Meseta Norte. Tiene una superficie aproximada de 39.000 ha distribuyéndose por el sureste de la provincia de Ávila, oeste de Madrid y norte de Toledo, desde los 400 m de altitud hasta los 1.800 m.

Las zonas ocupadas por *P. pinaster* corresponden a un fitoclima nemoromediterráneo genuino $VI(IV)_2$, aunque debido a la diferente altitud y longitud coexisten otros climas de transición como son el mediterráneo genuino IV_4 en las partes bajas y el oroborealoide subnemoral VIII(VI) en las altas.

Los suelos de esta zona son muy homogéneos, desarrollados sobre litologías graníticas, síliceos, con granulometría arenosa, horizonte de alteración cámbico y acidez moderada.

Destaca por una copa pequeña y un espesor de corteza medio. Tienen tendencia al policiclismo, buena calidad de fuste y crecimiento (Sierra de Grado, 1993) y tienen cierta similitud con las procedencias atlánticas (Nicolás y Gandullo, 1967), aunque en situaciones nemoromediterráneas su crecimiento es ampliamente superado por las procedencias gallegas y portuguesas.

El interés de esta población fue demostrado por Alía (1989) quien, analizando 52 poblaciones de toda el área de distribución de la especie, en 5 parcelas de ensayo situadas en distintos puntos de la región central de España, atendiendo al crecimiento, supervivencia, rectitud de fustes y conformación de copa, observó que esta procedencia se encontraba entre las mejores en el conjunto de las 5 parcelas. Debido a su buen comportamiento en cuanto a crecimiento, forma y supervivencia es muy importante desde el punto de vista de la mejora genética. Es la procedencia de más amplia utilización en la España mediterránea. Actualmente se está desarrollando un plan de mejora con esta población.

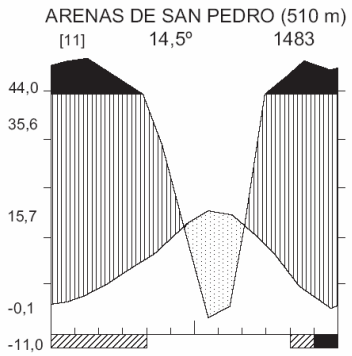


Fig. 5.- Climograma de Arenas de San Pedro. Región de procedencia Sierra de Gredos (Allué Andrade, 1990)

Se piensa que la población de *Pinus pinaster* de Gredos es espontánea, si por ello se entiende que llegó allí en algún momento lejano de la historia, sin que el hombre conscientemente la introdujera. Parece probable que el *Pinus pinaster* tuviera una extensión

más reducida que fue ampliada de manera artificial en los últimos tiempos a expensas de quercíneas en las cotas bajas y de *P. sylvestris* y *P. nigra* en las altas. En todo caso, los rasgos distintivos citados que caracterizan esta población sugieren que estos pinares han permanecido en la Sierra de Gredos al menos el tiempo suficiente como para evolucionar de forma distinta que el resto de las poblaciones españolas (Sierra de Grado, 1996).

Baradat y Marpeau (1988) incluyen esta población dentro del grupo Atlántico, junto con las poblaciones de Portugal, Noroeste de España, Tabuyo, Oña y Castilla la Vieja, basándose en el estudio de terpenos. Dentro de esta raza hay ciertas diferencias que la distinguen del resto de las poblaciones, como las proteínas de reserva de la semilla (Allona *et al.*, 1987 cit. Sierra de Grado, 1996) y su comportamiento en los ensayos de procedencia citados anteriormente (Alía, 1989), observando, este último, un comportamiento general diferente que lo separa de una manera clara del resto de las poblaciones de la Meseta Castellana.

2.1.10.4. Región de procedencia Meseta Castellana (8)

Es una de las regiones de procedencia de *P. pinaster* más extensas, 120.000 ha. Se extiende por los arenales a ambas orillas del río Duero, dando lugar a tres subunidades: Almazán-Bayubas, Tierra de Aranda y Meseta sur del Duero. Ocupa parte de las provincias de Zamora, Salamanca, Valladolid, Ávila, Segovia, Burgos y Soria. Desde una altitud de 700 m hasta 1.300 m aproximadamente.

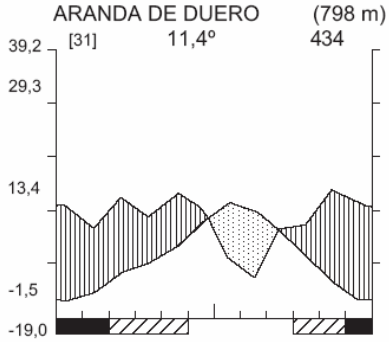


Fig. 6.- Climograma de Aranda de Duero. Región de procedencia Meseta Castellana. (Allué Andrade, 1990)

El clima es nemoromediterráneo genuino, $VI(IV)_1$, que pasa a mediterráneo nemoral, IV(VI), en zonas de mayor aridez como en los pinares de la provincia de Ávila y en pequeñas zonas de las de Salamanca y Zamora.

Mayoritariamente los pinares se sitúan sobre depósitos diluviales del Cuaternario formados, principalmente, por arenas silíceas de espesor muy variable. Los suelos son muy característicos, de textura arenosa y de gran permeabilidad. Son suelos de poca o media evolución, del grupo de los arenosoles, dando suelos más evolucionados, luvisoles, en zonas con mayores precipitaciones.

En conjunto, presentan fustes muy curvos y retorcidos y son de porte achaparrado y muy resistentes a la sequía (Goor y Barney, 1968), aunque presentan una cierta heterogeneidad, principalmente en la rectitud del fuste (Alía *et al*., 2001). Las ramas son gruesas, horizontales, de conos sésiles, de follaje tupido y acículas rígidas y casi punzantes. Las copas son medianamente grandes y la corteza relativamente gruesa.

La gran importancia del aprovechamiento resinero en esta zona, condicionó decisivamente las características de los pinos de esta región, al realizarse una selección negativa motivada por la extracción de los pies rectos de mayor utilidad y manteniendo árboles con más tendencia a la pérdida de la guía o de la dominancia apical en las primeras edades. Este hecho se muestra más importante debido a que la rectitud del fuste es una característica altamente heredable, dependiendo en gran medida de la procedencia y no presentando interacción procedencia-sitio (Alía *et al.*, 1995).

Foto 3.- Pinar en Arévalo, Región de procedencia Meseta Castellana

Su uso debe ser restringido localmente debido a la baja calidad de los fustes, aunque debe ser considerada la más adecuada para la producción de resina.

Al igual que las regiones de procedencia Noroeste, Sierra de Oña y Sierra de Gredos, pertenece al grupo Atlántico (Baradat y Marpeau, 1988).

Foto 4.- Corteza de un ejemplar de "pino femia" (izq.) y de otro de la Meseta Castellana (dcha.)

2.1.10.5. Región de procedencia Serranía de Cuenca (12)

Se sitúa en los tramos basales de la serranía, cubriendo las laderas de las cuencas del Tajo, Guadiana, Júcar y Turia. En la zona meridional discurren hacia el final del Sistema Ibérico y por el noroeste hacia la Alcarria. Existen numerosas masas más o menos fragmentadas que ocupan las sierras occidentales de la provincia de Cuenca, entre los 900 y 1.400 m de altitud. Ocupa las provincias de Cuenca, Valencia y Guadalajara, extendiéndose por una superficie aproximada de 75.000 ha.

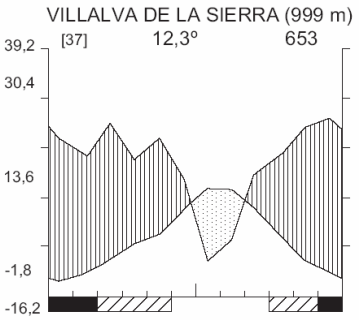


Fig. 7.- Climograma de Villalba de la Sierra. Región de procedencia Serranía de Cuenca (Allué Andrade, 1990)

Los fitoclimas mayoritarios son dos variantes de los nemoromediterráneos genuinos, VI(IV), con un gradiente altitudinal que incrementa la pluviometría, llegando a un clima próximo al mediterráneo continental hacia tierras meseteñas.

Se pueden distinguir tres sectores litológicos: el primero, oriental, formado por materiales triásicos con litofacies de dolomías, arcillas abigarradas y areniscas; el segundo, noroccidental, de conglomerados y calizas; y el tercero, sudoriental, de terrenos mesozoicos del Jurásico y Cretáceo con predominio de calizas, dolomías y margas.

Debido a la litología mencionada, los pinares crecen tanto sobre sustrato silíceo como calizo. Los primeros son suelos de texturas francas a francas bastante arenosas, de permeabilidad alta y con pH de neutro a moderadamente ácido. Debido a la alta pluviosidad estos suelos se integran dentro del grupo de los luvisoles. Los suelos básicos, cambisoles calcáricos, poseen una textura de franca a franca bastante limosa, con permeabilidad de baja a media, neutros a fuertemente básicos y parcialmente descarbonatados.

Son pinos de crecimiento medio-alto, algo mejor en diámetro que en altura.

Se recomienda su uso en amplias zonas mediterráneas debido a su comportamiento de fuste y crecimiento.

2.1.10.6. Región de procedencia Sierras de Segura-Alcaraz (17)

Engloba las sierras de Alcaraz, Cazorla y Segura, provincias de Albacete y Jaén, cubriendo una superficie ocupada por *Pinus pinaster* de más de 70.000 ha, entre los 600 y los 1.700 m de altitud, convirtiéndose en una de las representaciones más importantes de esta especie.

El fitoclima es nemoromediterráneo genuino $VI(IV)_2$, alternado con los mediterráneos genuinos IV_4 y IV_3.

La litología predominante está constituída por calizas, margas y areniscas mesozoicas.

Son suelos con abundante arcilla y limo, de color rojo o amarillo debido a la deshidratación parcial de los hidratos de hierro ligados a las arcillas. Su textura es de limoso-arcillosa a franca bastante limoso-arcillosa y de pH moderado a fuertemente básico.

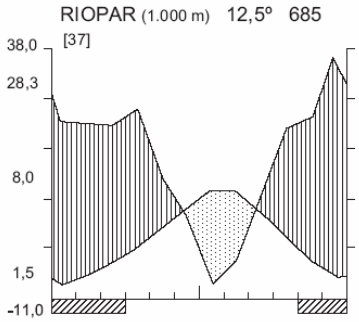


Fig. 8.- Climograma de Riopar. Región de procedencia Segura-Alcaraz. (Allué Andrade, 1990)

Son masas formadas por árboles derechos (Martín Bolaños y Vicioso, 1956 y 1957), con tronco limpio de ramas y no muy altos. La corteza es relativamente delgada y no muy oscura. La copa es grande, muy ramificada y chata en los árboles adultos. El follaje es denso y oscuro, y acículas con inserciones muy próximas que lo hace muy poco permeable a los rayos del sol. Las piñas, que suelen ser grandes y de forma cónico aguda con apófisis salientes, se encuentran agrupadas en verticilos muy próximos y permanecen adheridas sin abrir dos o más años.

En relación con otras procedencias es muy tolerante a la sequía.

Es de amplio uso en terrenos calizos de la zona sur de España.

2.1.10.7. Región de procedencia Sierra Bermeja (20)

Se sitúa en la región occidental de la provincia de Málaga, en Sierra Bermeja, Sierra Palmitera y Sierra Real, entre los 200 y 1.400 m de altitud, con una superficie cercana a 23.000 ha.

El fitoclima es mediterráneo genuino con tendencia al nemoromediterráneo.

La roca madre de esta región es muy característica, peridotitas del sector occidental alpujárride, aunque también existen pinares sobre suelos procedentes de rocas metamórficas (micaesquistos, cuarcitas y mármoles).

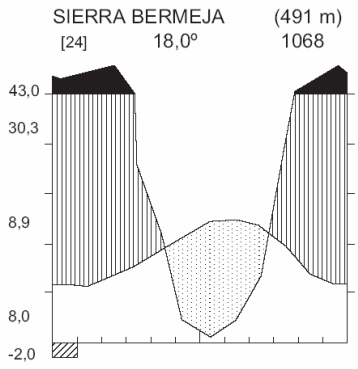


Fig. 9.- Climograma de Sierra Bermeja (Allué Andrade, 1990)

Tabla 1.- Tabla resumen de las características de los distintos orígenes de *P. pinaster*. F.- franco; A.- arenoso; L.- limoso; a.- arcilloso; a'.- ácido; b'.- básico; mb'.- medianamente básico; ma'.- medianamente ácido; Tmed.- temperatura media anual; TM.- temperatura media de las máximas del mes más cálido; Tm.- temperatura media de las mínimas del mes más frío; *.- grupos según Baradat y Marpeau (1988)

CARACTERÍST.	Sª. Bermeja	Serranía de Cuenca	Sª. de Segura-Alcaraz	Sª. de Gredos	M. Castellana	Sª. de Oña	Noroeste
GRUPO*	Maghrebí	Perimediterráneo	Perimediterráneo	Atlántico	Atlántico	Atlántico	Atlántico
SUPERFICIE (ha)	23.000		70.000	39.000	120.000	15.000	
LATITUD	35º55' - 36º11'	39º25' - 40º37'	37º4' - 38º46'	40º07' - 40º27'	40º45' - 41º48'	42º51' - 42º54'	41º53' - 43º46'
LONGITUD	4º45' - 5º15'	0º53' - 2º25'	1º57' - 3º00'	4º17' - 5º10'	2º21' - 5º44'	3º17' - 3º35'	5º35' - 9º15'
ALTITUD (m)	200-1.000	800-1.200	800-1.400	600-1.400	700-1.000	700-1.000	600-800
FITOCLIMA	IV_2, IV_4 - $VI(IV)_2$, $VI(IV)_3$	$VI(IV)_1$, $VI(IV)_2$, $IV(VI)_1$	IV_3, IV_4, $VI(IV)_2$	$VI(IV)_2$, IV_4	$VI(IV)_1$, IV(VI)	$VI(IV)_1$, $VI(IV)_2$	$VI(IV)_2$, VI(V)
TEXT. SUELO	Aa	(1) F-FA (2) F-FL	La-Fla	A	A	A	F-FA
pH	a	(1) b (2) ma	ma	b		a-ma	mb
Tmed (ºC)	18,0	12,3	12,5	14,5	11,4	11,3	11,1
TM (ºC)	45,0 / 30,3	39,2 / 30,4	38,0 / 28,3	44,0 / 35,6	39,2 / 29,3	39,9 / 26,6	38,0 / 26,1
Tm (ºC)	-2,0 / 8,0	-16,2 / -1,8	-11,0 / 1,5	-11,0 / -0,1	-19,0 / -1,5	-16,9 / 0,1	-12,0 / 0,4
PLUVIOM. (mm)	1068	653	685	1483	434	661	1552
FUSTE	corto		dcho., sin ramas	bueno	retorcido	poco recto	recto
FORMA					achaparrado	rechoncha	
COPA	amplia, ojival		grande, ramif.	peq.	grande	amplia	peq.
POLICICLISMO				sí		sí	
CORTEZA	gruesa, negruzca		fina, clara	grosor medio	relat. gruesa		fina y lisa
SEQUÍA			muy tolerante		muy resist.		

Los suelos son de evolución media, cambisoles, de texturas francas algo arenoso-arcillosas, neutros a moderadamente básicos.

Son pinos adaptados a los incendios, con abundantes conos serótinos que permiten la recuperación del pinar tras el incendio forestal. Los árboles tienen el tronco corto, ritidoma grueso y negruzco, copa ojival amplia de denso y oscuro follaje, piñas grandes, con apófisis de las escamas vulnerantes y algo revueltas (Martín Bolaños y Vicioso, 1957).

Esta población presenta una variación alélica en isoenzimas que la diferencia de las poblaciones cercanas (Salvador, 1996, datos no publicados, cit. Alía *et al.* 1996).

Baradat y Marpeau (1988) incluyen esta población dentro del grupo Maghrebí, junto con otras de Marruecos, del sur de la Península Ibérica y la isla de Pantellaria.

Se trata de una procendencia muy poco ensayada y con características muy partículares lo que hace que su eso no sea generalizado y se emplee únicamente de forma local.

2.2. Las micorrizas

2.2.1. Definición de las micorrizas

Los hongos son seres vivos heterótrofos, incapaces de sintetizar sustancias orgánicas a partir de elementos inorgánicos, por lo que, para nutrirse, necesitan material orgánico que haya sido producido por otros organismos. Esta característica les obliga a depender de otros organismos, creando así estrechas relaciones ecológicas de tipo trófico de orden superior: hongos saprófitos, parásitos y simbiontes.

Los hongos micorrícicos son hongos simbiontes que se asocian a plantas superiores, produciéndose un intercambio bidireccional de sustancias con un beneficio para ambas partes. Por un lado la planta ofrece al hongo un nicho ecológico adecuado y sustancias orgánicas elaboradas mediante la fotosíntesis y por otro, el hongo proporciona a la planta un órgano suplementario de absorción, acumulación y transporte de agua y nutrientes, el suministro de ciertas sustancias como enzimas, vitaminas, o reguladores de crecimiento, o defensa contra el ataque de organismos patógenos del suelo.

Las micorrizas son una asociación particularmente interesente formada por las hifas de un hongo micorrícico y una porción terminal de sistema radical de una planta. Se podrían definir como *raíces modificadas formadas por la asociación entre raíces nutridoras de plantas verdes y hongos altamente especializados que viven en esas raíces* (Rodríguez, 1995). Esta asociación resulta especialmente importante debido al papel que desempeñan

tanto en ecosistemas naturales como en sistemas biológicos humanizados (Harley y Smith, 1983).

2.2.2. Tipos de micorrizas

En función de sus características morfológicas y de la taxonomía de la micorriza (asociación hongo-planta) se definen siete tipos de micorrizas (Harley y Smith, 1983): Arbusculares, Ectomicorrizas, Ectendomicorrizas, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquidáceas.

2.2.2.1. Micorrizas arbusculares

Hasta hace pocos años se solían denominar micorrizas vesículo-arbusculares (VAM), actualmente se ha generalizado el uso de micorrizas arbusculares (AMF), debido a que no todos los hongos de este grupo presentan vesículas.

Es una simbiosis muy común en Angiospermas, ya que hay pocas familias en las que no se ha descrito (*Urticaceae, Polygonaceae, Commelinaceae, Papaveraceae, Fumariaceae, Amaranthaceae, Portulaccaceae, Brassicaceae, Rubiaceae, Chenopodiaceae, Capparidaceae, Zygophyllaceae* y *Caryophyllaceae*) (Maronek *et al.*, 1981). También se ha descrito en otros grupos vegetales como Pteridofitos (Iqbal *et al.*, 1981), Gimnospermas (Bonfante-Fasolo y Fontana, 1985) y Briofitos (Rabatin, 1980).

Su taxonomía ha cambiado en los últimos años debido principalmente a los avances en biología molecular. Actualmente se incluyen en el orden *Glomerales* dentro del phylum *Zygomycota* (Morton y Benny, 1990), aunque la última revisión propuesta por Schübler *et al.*, (2001), crea un nuevo phylum, el *Glomeromycota*, dividido en cuatro órdenes y ocho familias:

- *Paraglomerales*
  - *Paraglomeraceae*
- *Archaesporales*
  - *Archaesporaceae*
  - *Geosiphonaceae*
- *Diversisporales*
  - *Acaulosporaceae*
  - *Diversisporaceae*
  - *Gigasporaceae*
- *Glomerales*

- *Glomeraceae* (*Glomus*-grupo A)
- *Glomeraceae* (*Glomus*-grupo B)

La morfología de este tipo de micorriza se caracteriza por la presencia de dos tipos de micelio: el extraradicular, constituído por hifas aseptadas cuya misión, debido al desarrollo que alcanza, podría ser la de exploración y absorción (Hayman y Mosse, 1972); y el intraradicular, que se desarrolla en el interior de la raíz, con excepción de la endodermis, tejidos vasculares y meristemos. Las hifas del micelio intraradicular forman pequeñas ramas laterales que penetran en la célula y que posteriormente se ramifican intensamente dando lugar a arbúsculos, además suelen aparecer protuberancias denominadas vesículas, en cuyo interior se almacenan fundamentalmente lípidos, y cuya función parece ser la de actuar como órganos de reserva (Scannerini y Bonfante-Fasolo, 1983).

2.2.2.2. Ectomicorrizas

Entre un 3% y un 5% de las especies vegetales superiores forman ectomicorrizas (Meyer, 1973; Trappe, 1977). Esta cifra puede parecer pequeña, sobre todo si se compara con las AMF que están presentes en la casi totalidad de las especies vegetales. Sin embargo, este hecho no implica una menor importancia ecológica y/o económica (Rodríguez, 1995), dado que se encuentran tanto en Angiospermas como en Gimnospermas, y en familias de gran interés agrícola y forestal, como *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Junglandaceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae*, *Tiliaceae*, *Ulmaceae*, *Cupressaceae* y *Pinaceae* (Harley y Smith, 1983). En algunos casos es posible la formación tanto de ectomicorrizas como de AMF, como ocurre en los géneros *Eucalyptus*, *Cupressus*, *Salix*, *Betula*, *Corylus*, *Alnus*, *Ulmus*, *Pyrus* y *Acer* (Meyer, 1973).

En cuanto al componente fúngico, los hongos ectomicorrícicos son generalmente Basidiomicetos o Ascomicetos, aunque nos podemos encontrar con alguna especie dentro del género *Endogone* perteneciente a los Ficomicetos, así como algún hongo imperfecto del género *Cenococcum* (Harley y Smith, 1983). La mayoría de los hongos de interés comercial que forman ectomicorrizas se hallan incluídos en los Basidiomicetos (*Boletus*, *Lactarius*, *Amanita*...) o en los Ascomicetos (*Tuber*, *Terfezia*...).

En las raíces con ectomicorrizas se pueden observar las siguientes estructuras:

- El manto, formado por las hifas del hongo simbionte que rodean las raíces finas de la planta. Su color, espesor y densidad es variable, utilizándose como característica taxonómica.

- La red de Hartig, estructura formada por la penetración de las hifas en los espacios intercelulares del córtex de la raíz pero sin penetración celular.
- El micelio extraradical, formado por las hifas que se desarrollan de forma más o menos densa en la zona periradicular. En algunas ocasiones pueden llegar a formarse cordones miceliares y rizomorfos con función de transporte.

2.2.2.3. Ectendomicorrizas

Es un tipo intermedio de asociación micorrícica caracterizada por un manto reducido o ausente, una red de Hartig bien desarrollada y penetración de hifas en el interior de las células de la raíz (Harley y Smith, 1983). Se ha descrito en viveros de coníferas.

2.2.2.4. Ericoides

Las características fundamentales son la formación de un manto rudimentario y la existencia de hifas inter e intracelulares. Los hongos responsables suelen ser un Basidiomiceto y, a veces, un Ascomiceto, encontrándose en *Ericaceae, Epacridaceae* y *Empetraceae*. Este tipo de simbiosis tiene un especial interés debido a su adaptación a determinados tipos de suelos ácidos y a su incidencia en la absorción y acumulación de nutrientes, especialmente el nitrógeno (Read, 1978 cit. Harley y Smith, 1983).

2.2.2.5. Arbutoides

Están constituídas por un manto perfectamente definido, micelio externo, normalmente posee red de Hartig, y existe penetración de hifas en el interior de las células radiculares. Es de difícil catalogación debido a este carácter mixto y a su localización tan restringida, ya que las plantas huésped pertenecen a los géneros *Arbutus* y *Arctostaphylos*, y a que el componente fúngico es único: un Basidiomiceto. Molina y Trappe (1982) las consideran un tipo especial de ectomicorriza.

2.2.2.6. Monotropoides

Este tipo de simbiosis aparece en plantas parásitas carentes de clorofila, pertenecientes a la familia *Monotropaceae* (Orden *Ericales)*. Las raíces están rodeadas de un manto fúngico de varias capas de hifas que están conectadas a la red de Hartig. Presenta pequeños haustorios que penetran en el interior de las células. En este caso, debido al parasitismo de la planta, el carbono necesario para la nutrición del hongo procede de otra planta (Harley y Smith, 1983).

2.2.3. Las ectomicorrizas

2.2.3.1. Funciones de las ectomicorrizas

2.2.3.1.1. Absorción de agua y nutrientes

Muchas de las funciones de las ectomicorrizas derivan de su propia estructura. En este sentido el amplio terreno explorado por el micelio extraradicular, tanto por las hifas como por cordones miceliares o rizomorfos, proporciona a la planta una mayor facilidad para la absorción de agua y nutrientes, tanto por facilitar el transporte como por explorar zonas de suelo a la que las raíces no llegarían por si mismas. Harley y Smith (1983) demostraron que las raíces nutridoras de las plantas micorrizadas tienen una mayor longevidad, con lo que la función de absorción se ve potenciada. En árboles no micorrizados estas raíces se renuevan de 2 a 3 veces al año (Marshall, 1986) o incluso más, sin embargo, en árboles micorrizados las ectomicorrizas persisten aparentemente en estado funcional desde varios meses hasta 8 años (Hermann, 1977; Trappe y Fogel, 1977).

En cuanto a la gran superficie de absorción adicional que el hongo confiere a la planta, se han llegado a encontrar hifas a 5 metros de la raíz (Schramm, 1966 cit. Alvarez, 1993). De esta forma se puede comprender el papel fundamental que el micelio extraradicular desempeña en las relaciones hídricas con la planta, aumentando el transporte de agua (Duddridge *et al.*, 1980; Finlay y Read, 1986 a, 1986 b) y la resistencia en condiciones hídricas limitantes (Sands y Theodorou, 1978; Dixon *et al.*, 1980).

La absorción de nutrientes también se ve incrementada por la presencia de micorrizas, destacando el aumento en la captación de nitrógeno (Waring y Schlesinger, 1985), debido, entre otras causas, a que son capaces de absorber fuentes de nitrógeno que la planta no puede como nitrógeno amoniacal o en forma de nitrato e incluso nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos y otros compuestos (Bowen, 1973; Cooke y Whipps, 1993).

Otro elemento del que se ven beneficiadas las plantas micorrizadas es el fósforo debido a un incremento de su absorción por la acción de hongos micorrícicos, capaces de asimilar fuentes de fosfatos que no serían asimilables por las raíces de las plantas en otras circunstancias. El fósforo se almacena en el manto en forma de gránulos y se moviliza cuando es requerido por la planta (Strullu *et al.*, 1983).

Otros elementos como el potasio (Harley y Smith, 1983), sodio (Bowen, 1973) y zinc (Skinner *et al.*, 1972 cit. Bowen, 1973) también se incrementan en plantas micorrizadas. Además, las micorrizas incluso son capaces de ejercer una acción limitante en la absorción de

ciertos elementos que se encuentran en concentraciones excesivas en algunos suelos permitiendo la supervivencia y el desarrollo de las plantas, como ocurre con el calcio en suelos calcáreos (Clement *et al.*, 1977).

2.2.3.1.2. Producción de sustancias reguladoras de crecimiento

Los hongos micorrícicos producen sustancias reguladoras de crecimiento (auxinas) (Slankis, 1973), principalmente ácido indolacético (Ulrich, 1960), citoquininas y giberelinas (Miller, 1971) y vitaminas como biotina, tiamina y ácido pantoténico (Shemakhanova, 1962). Esto tiene una gran importancia ya que estas sustancias influyen decisivamente en muchos procesos relacionados con el desarrollo de las plantas como la translocación de nutrientes, el desarrollo de cloroplastos, la inducción en la iniciación del crecimiento y la dicotomía de las raíces o la inhibición de la suberización de las raíces nutridoras.

2.2.3.1.3. Protección contra ataques de hongos patógenos del suelo

Es una faceta de estudio muy importante en los últimos años debido al interés que presenta la acción protectora de las micorrizas sobre la infección de hongos patógenos del suelo, sobre todo por sus implicaciones económicas y ecológicas.

La resistencia de las micorrizas a las infecciones de agentes patógenos se ha atribuído a las siguientes causas:

- la barrera física constituída por el manto fúngico (Marx, 1972).
- la producción de sustancias antibióticas por la micorriza (Marx, 1973).
- la producción de compuestos fungiestáticos, como fenoles, terpenos, ácido isobutírico y etileno, entre otros (Marx, 1973; Krupa y Fries, 1971; Graham y Linderman, 1980).
- modificaciones en los exudados de las raíces micorrizadas que dificultan el establecimiento de los agentes patógenos en la rizosfera (Malajzuk y McComb, 1977; Linderman, 1988).
- la presencia de poblaciones microbianas en la rizosfera de la planta, antagonistas a los agentes patógenos (Marx, 1973).

2.2.3.2. Aplicaciones prácticas de las ectomicorrizas

En dos aspectos podemos dividir las aplicaciones prácticas e inmediatas de las micorrizas: todas aquellas aplicaciones que van destinadas a la mejora directa de la planta y

sus condiciones de cultivo (supervivencia al trasplante, velocidad de crecimiento, ahorro de fertilizantes, defensa frente a agentes patógenos...) y las encaminadas a la producción de carpóforos de hongos comestibles.

Respecto al primer punto, está ya generalizado que las micorrizas deberían constituír un elemento de vital importancia en las operaciones de un vivero forestal, sobre todo teniendo en cuenta que su efecto sobre la planta puede ser variable, debido a que depende del hongo, de la planta y de las manipulaciones concretas del vivero (Castellano y Molina, 1989). Habría que hacer también hincapié en todas aquellas labores que inciden negativamente en la micorrización como el uso de herbicidas, el uso de sustratos artificiales carentes de inóculo, uso excesivo de fertilizantes, etc.

En general las especies forestales a las que va dirigido este tipo de micorrización son coníferas (*Pinus, Picea, Abies, Pseudotsuga*...) y los hongos con los que se suelen inocular son fundamentalmente *Pisolithus tinctorius, Laccaria laccata, L. bicolor, Cenoccocum geophilum y Hebeloma crustuliniforme*, todas ellas sin valor comercial desde el punto de vista gastronómico.

Respecto a la importancia de las ectomicorrizas por la producción de carpóforos comestibles, actualmente no es muy importante en relación con el conjunto de trabajos realizados con micorrizas, aunque históricamente la primera aplicación de las micorrizas fuera de cara al desarrollo del cultivo de la trufa. En la actualidad dada la importancia económica que tienen estos hongos en algunos países como Francia, Italia, España y, en menor medida, Portugal, los trabajos sobre hongos ectomicorrícicos comestibles van dirigidos, fundamentalmente, al aumento de la producción de trufa. Con relación a otras especies, la mayor parte de los trabajos versan sobre especies muy apreciadas en los mercados, pertenecientes al género *Boletus* (*B. edulis* (Tozzi *et al.*, 1980; Zuccherelli, 1988), *B. aereus* (Cerruti *et al.*, 1985), *B. fragrans* (Fernández de Ana-Magán *et al.*, 1989; Rodríguez, 1995) y *Lactarius* (*L. deliciosus* (Poitou *et al.*, 1984; Gracia cit. Gracia *et al.*, 1993)).

Con todo, el principal problema viene a la hora de mantener los hongos inoculados en el sistema radicular de la planta micorrizada, una vez que ésta ha sido trasplantada al campo, ya que a menudo son desplazados por los hongos nativos.

2.2.3.3. Manejo de las ectomicorrizas

La selección, aislamiento, cultivo e inoculación de los hongos ectomicorrícicos son fases indispensables para la micorrización, y exigen la puesta a punto de una serie de técnicas que permitan la producción de planta micorrizada adecuada y con garantías.

2.2.3.3.1. Selección de hongos ectomicorrícicos

En general, la mayoría de las especies vegetales susceptibles de formar ectomicorrizas pueden asociarse con un amplio espectro de hongos ectomicorrícicos. Sin embargo cada especie fúngica e incluso las diferentes cepas de una misma especie originan respuestas diferentes en la planta. De ahí que uno de los pasos más importantes en los programas de inoculación sea la fase de selección (Trappe, 1977).

Molina y Trappe (1982), clasifican los hongos en tres grupos según su capacidad de formar ectomicorrizas con diferentes huéspedes:

- hongos con un amplio potencial de huéspedes, de baja especificidad, en el que los esporocarpos se encuentran asociados a diferentes huéspedes en el campo
- hongos con un potencial de huéspedes intermedio o con limitaciones en las asociaciones esporocarpo-huésped
- hongos con un estrecho abanico de huéspedes que sólo son capaces de formar ectomicorrizas con una especie de huésped específica o con especies de un género determinado

Según esta clasificación, Molina y Trappe (1982), clasifica a *Laccaria laccata, Paxillus involutus* y *Pisolithus tinctorius* dentro del primer grupo (hongos con un amplio potencial de huéspedes o de baja especificidad). Estas especies resultan especialmente interesantes debido a su gran capacidad de infección independientemente de donde se hayan recogido.

Las características más importantes que debería reunir un buen hongo micorrícico (Trappe, 1977; Kropp y Langlois, 1990; Marx y Kenney, 1982) son:

- la capacidad fisiológica para la producción de ectomicorrizas con la especie vegetal en cuestión
- la adaptación del hongo al lugar donde la planta va a ser implantada

- la capacidad colonizadora y competitiva de la cepa introducida
- su grado de adaptación a las condiciones ambientales, tanto en vivero como en plantación
- su efecto sobre la supervivencia y el crecimiento de los árboles
- en cuanto al aspecto operativo, la capacidad de obtener o producir cantidades suficientes de inóculo viable y efectivo

En este sentido, diversos autores (Thivolle-Cazat, 1987; Kropp y Langlois, 1990) señalan la importancia de seleccionar cepas de hongos que presenten un amplio espectro de hospedantes y una gran adaptabilidad a los lugares donde van a ser implantados.

A continuación se describen con detalle las características de los hongos ectomicorrícicos seleccionados.

2.2.3.3.1.1. *Pisolithus tinctorius*

Pisolithus tinctorius (Pers.) Cok. y Couch. (= *P. arhizus* (Scop.: Pers) Rausch.)

Pisolithus tinctorius es uno de los hongos ectomicorrícicos más estudiados y mejor conocidos. Ha sido ampliamente utilizado en la inoculación de plantas en viveros forestales (Marx *et al.*, 1982, 1984). De los trabajos de investigación destinados a determinar el efecto de la micorrización controlada en el establecimiento de masas forestales, más de la mitad se han realizado con esta especie fúngica (Castellano, 1990; Trotimov, 1990, Pera *et al.*, 1994). La reforestación con plantas micorrizadas con *P. tinctorius* ha dado buenos resultados en la introducción de especies exóticas y en la recuperación de zonas degradadas de diverso origen (Marx, 1980; Ruehle, 1989; Marx *et al.*, 1991).

La compatibilidad e infectividad entre hongo y planta varían con el origen geográfico y genético de los simbiontes (Marx, 1981; Malajezuk *et al.*, 1990) y distintas cepas de una misma especie fúngica producen diversos efectos sobre el crecimiento del árbol (Laiho, 1970; Molina, 1979; Le Tacon, Bouchard, 1986; Perry *et al.*, 1987).

Este hongo posee un amplio espectro de huéspedes (Molina y Trappe, 1982). Se han descrito las siguientes especies vegetales asociadas:

Abies procera (Molina y Trappe, 1982)
Arbutus menziesii (Molina, 1979)
Betula lenta (Meyer, 1968)
Betula nigra (Molina y Trappe, 1982)

Betula pendula (Nicholas, 1971)
Betula populifolia (Meyer, 1968)
Carya illionoensis (Molina y Trappe, 1982)
Eucalyptus bidgesiana (Chilvers, 1973)
Eucalyptus camaldulensis (Neumann, 1959)
Eucalyptus dalrympleana (Chilvers, 1973)
Eucalyptus fastigiata (Chilvers, 1973)
Eucalyptus gummifera (Mullette, 1976)
Eucalyptus leucoxylon (Chilvers, 1973)
Eucalyptus masculata (Chilvers, 1973)
Eucalyptus microcorys (Molina y Trappe, 1982)
Eucalyptus polyanthemos (Chilvers, 1973)
Eucalyptus radiata (Chilvers, 1973)
Eucalyptus robusta (Molina y Trappe, 1982)
Eucalyptus sieberi (Chilvers, 1973)
Lithocarpus densiflorus (Molina, 1979)
Pinus ayacahuite (Marx, 1975)
Pinus banksiana (Lampky y Peterson, 1963; Marx y Bryan, 1973)
Pinus caribea (Mikola, 1969; Molina y Trappe, 1982)
Pinus caribea var. *bahamensis* (Molina y Trappe, 1982)
Pinus caribea var. *caribea* (Molina y Trappe, 1982)
Pinus caribea var. *hondurensis* (Molina y Trappe, 1982)
Pinus cembra (Molina y Trappe, 1982)
Pinus clausa var. *clausa* (Ross y Marx, 1972)
Pinus clausa var. *immuginata* (Ross y Marx, 1972)
Pinus contoria (Molina y Trappe, 1982)
Pinus densiflora (Marx y Bryan, 1973)
Pinus echinata (Bryan y Zak, 1961; Molina y Trappe, 1982)
Pinus elliottii (Lamb y Richards, 1974)
Pinus ellitottii var. *elliottii* (Marx y Bryan, 1973)
Pinus halepensis (Ruehle *et. al.,* 1981)
Pinus khasya (Molina y Trappe, 1982)
Pinus lambertiana (Molina y Trappe, 1982)
Pinus leiophylla (Marx, 1975)
Pinus merkusii (Van Suchtelen, 1962)

Pinus michoacana (Marx, 1975)
Pinus montana (Molina y Trappe, 1982)
Pinus mugo (Molina y Trappe, 1982)
Pinus nigra (Marx y Bryan, 1970)
Pinus occidentalis (Molina y Trappe, 1982)
Pinus oocarpa (Molina y Trappe, 1982)
Pinus palustris (Marx y Bryan, 1970; Lampky y Lampky, 1973)
Pinus patula (Van Suchtelen, 1962; Molina y Trappe, 1982)
Pinus pinaster (Van Suchtelen, 1962; Pera, 1993)
Pinus ponderosa (Molina, 1979; Molina y Trappe, 1982)
Pinus pseudostrobus (Marx, 1975)
Pinus radiata (Lamb y Richards, 1974)
Pinus resinosa (Marx y Bryan, 1970; Molina y Trappe, 1982)
Pinus rigida (Marx y Bryan, 1970)
Pinus rudis (Marx, 1975)
Pinus serotina (Suggs y Bryan, 1973)
Pinus strobus (Marx y Bryan, 1970)
Pinus sylvestris (Marx y Bryan, 1970)
Pinus taeda (Lowry, 1964; Marx y Bryan, 1970; Molina, 1979; Molina y Trappe, 1982)
Pinus teocote (Marx, 1975)
Pinus tremuloides (Schramm, 1966)
Pinus virginiana (Marx y Bryan, 1970)
Populus tremuloides (Meyer, 1968*)*
Pseudotsuga menziesii (Trappe, 1963; Molina, 1979)
Quercus acutissima (Molina y Trappe, 1982)
Quercus agrifolia (Molina y Trappe, 1982)
Quercus alba (Molina y Trappe, 1982)
Quercus gambelii (Molina y Trappe, 1982)
Quercus garryana (Molina, 1979)
Quercus lobata (Molina y Trappe, 1982)
Quercus palustris (Molina y Trappe, 1982)
Quercus rubra (Molina y Trappe, 1982)
Quercus velutina (Schamm, 1966)
Quercus virginiana (Lowy, 1964)

Salix humilis (Meyer, 1968)
Tsuga heterophyla (Molina y Trappe, 1982)

2.2.3.3.1.2. *Paxillus involutus*

Paxillus involutus (Batsch ex Fr.) Fr.

P. involutus fue ampliamente estudiado por Laiho (1970) en Europa. Este autor describió la formación de micorrizas, tanto bajo condiciones asépticas como semiasépticas con numerosos géneros de especies vegetales. Lo observó prosperando, únicamente, sobre suelos ricos en nitrógeno asimilable. Malajczuk *et al.* (1982) la describió también con varias especies de *Eucalyptus* e incluso se ha descrito formando micorrizas arbutoides con *Arbutus menziesii* y *Arctostaphylos uva-ursi* (Molina y Trappe, 1982).

Los estudios de Laiho (1970) y otros han demostrado la existencia de un amplio espectro de huéspedes de *P. involutus*, así como su gran efectividad en la colonización de raíces, llegando a superar el 75% de ápices radicales micorrizados en la totalidad de las especies ensayadas en algún caso (Molina y Trappe, 1982).

Se ha descrito en los siguientes géneros y/o especies:

Alnus (Laiho, 1970)
Arbutus menziesii (Molina y Trappe, 1982)
Arctostaphylos uva-ursi (Molina y Trappe, 1982)
Betula (Laiho, 1970)
Betula pendula (Molina y Trappe, 1982)
Castanea sativa (Strullu et al., 1986)
Castanea crenata x Castanea sativa (Chauvin, 1988)
Eucalyptus (Malajczuk *et al.*, 1982)
Fagus (Laiho, 1970)
Picea (Laiho, 1970)
Pinus contorta (Molina y Trappe, 1982)
Pinus pinaster (Branzanti y Zambonelli, 1987; Pera y Alvarez, 1995)
Populus (Laiho, 1970)
Populus trichocarpa (Molina y Trappe, 1982)
Pseudotsuga (Laiho, 1970)
Pyrus (Laiho, 1970)
Quercus (Laiho, 1970)

Rhamnus (Laiho, 1970)
Salix (Laiho, 1970)
Tsuga (Laiho, 1970)
Tsuga heterophylla (Molina y Trappe, 1982)

2.2.3.3.1.3. *Laccaria laccata*

Laccaria laccata (Scop. ex Fr.) Bk. y Br

Es un hongo ectomicorrícico bien conocido. Trappe (1962) lo cita en asociación con siete géneros distintos de huésped. Se ha descrito, al igual que *Paxillus involutus,* formando micorrizas arbutoides con *Arbutus menziesii* y *Arctostaphylos uva-ursi* (Molina y Trappe, 1982). En estudios realizados por Molina y Trappe, 1982, *L. laccata* formó ectomicorrizas bien desarrolladas con todos los huéspedes ensayados, colonizando a menudo el sistema radicular completo. Molina y Trappe, 1982, definen a *L. laccata* como hongo micorrícico poco específico, con amplio potencial de huéspedes.

Se ha descrito en los siguientes géneros y/o especies:

Abies spp. (Molina y Trappe, 1982)
Arbutus menziesii (Molina y Trappe, 1982)
Arctostaphylos uva-ursi (Molina y Trappe, 1982)
Picea sitchensis (Molina y Trappe, 1982)
Pinus contorta (Molina y Trappe, 1982)
Pinus pinaster (Pera, 1993)
Pinus ponderosa (Molina y Trappe, 1982)
Pseudotsuga menziesii (Molina y Trappe, 1982)
Tsuga mertensiana (Molina y Trappe, 1982)

2.2.3.3.1.4. *Boletus badius*

Boletus badius Fries (=*Xerocomus badius*)

Es un hongo escasamente estudiado. Se ha descrito en pocas especies de huésped, algunas de ellas son *Castanea sativa* y *Pinus pinaster* (Fernández de Ana Magán *et al.*, 2000). La amplia difusión de esta especie en Galicia así como sus excepcionales propiedades organolépticas, la hace especialmente interesante en esta región donde sus especies arbóreas asociadas están ampliamente extendidas.

Se ha descrito en las siguientes especies:

Castanea sativa (Fernández de Ana Magán *et al.*, 2000)
Pinus pinaster (Fernández de Ana Magán *et al.*, 2000)
Pinus radiata (Duñabeitia *et al.*, 1996)

2.2.3.3.2. Aislamiento y cultivo de hongos ectomicorrícicos

Otra fase fundamental dentro de los procesos de inducción a la micorrización es el conjunto de operaciones que llevan al aislamiento de micelio del hongo deseado, su mantenimiento y la posterior producción de inóculo en cantidades y condiciones adecuadas.

La forma más común y segura de obtener cultivos puros de hongos ectomicorrícicos se basa en los trabajos realizados por Molina y Palmer (1982). Esta técnica parte de los tejidos internos de carpóforos jóvenes, sanos y limpios y consiste en cortar pequeños trozos de su interior, que no evidencien ningún contacto con posibles fuentes de contaminación externa, y colocarlos de forma aséptica en un medio de cultivos con agar MMN (Melin Norkrans modificado) (Marx, 1969). Los cultivos mantenidos a una temperatura de 20-25 ºC se empiezan a observar a partir de varios días, dependiendo de la especie fúngica.

Existen otros métodos de aislar hongos ectomicorrícicos que se basan en la utilización de raíces micorrizadas (Zak y Marx, 1964), esporas (Fries, 1978), o rizomorfos (Molina y Palmer, 1982), sin embargo, debido al éxito del aislamiento a partir de tejidos del esporocarpo raramente se utilizan.

El segundo paso, después de haber aislado el hongo con éxito, consiste en su cultivo en medios nutritivos, sólidos o líquidos, que permiten la obtención de la cantidad de micelio necesaria para su posterior empleo.

Los medios utilizados para el aislamiento y cultivo de hongos micorrícicos suelen tener una gama de nutrientes que cubren sus necesidades nutritivas.

La fuente más normal de carbono suele ser los hidratos de carbono, siendo uno de los más utilizados la d-glucosa y obteniéndose peores resultados con azúcares de 3, 4 ó 5 carbonos. También se suelen usar disacáridos (celobiosa, maltosa, trealosa...) y polisacáridos (Molina y Palmer, 1982).

La fuente de nitrógeno inorgánico más fácilmente asimilable es la amoniacal, por lo que se suelen utilizar sales de amonio como cloruro amónico y nitrato amónico (Ferri, 1985) utilizándose también en los medios sintéticos el tartrato amónico.

Otros nutrientes que también se incorporan en los medios de cultivos son el fósforo, potasio, azufre, magnesio, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc, aunque en cantidades mucho más pequeñas.

Además de estos nutrientes los hongos necesitan otras sustancias que no son capaces de sintetizar, denominadas factores de crecimiento (Ferri, 1985), como tiamina, vitamina B_1, biotina, riboflavina (B_2), ácido nicotínico y piridosina (B_6).

Se conoce una gran cantidad de medios de cultivo para el desarrollo de hongos ectomicorrícicos aunque el más utilizado es el Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969). La generalización de este medio de cultivo se ha debido a sus buenos resultados con los hongos micorrícicos normalmente utilizados en investigación y a una cierta inercia y/o lasitud que hace que se vengan utilizando los medios y técnicas conocidos, mientras no se obtengan malos resultados. Sin embargo es bien sabida la gran diferencia de comportamiento de las diferentes especies de hongos e incluso diferentes cepas de una misma especie de hongo (Molina, 1979; Rodríguez *et al.,* 1992) por lo que cabe esperar que también reaccionen de distinta manera frente a medios de cultivo diferentes (Poitou, 1978; Torres y Honrubia, 1991). Otros medios de cultivo utilizados, aunque en menor medida, son Hagen (Modess, 1941), Melin y Rama Das (Melin y Rama Das, 1954), Palmer y Hacskaylo (Palmer y Hacskaylo, 1970), Oddoux (Bruchet, 1973), Pachlewska (Pachlewski y Pachlewska, 1974), Raper (Raper y Raper, 1972), Malta 4%, BAF (Moser, 1960) y PDA (patata-dextrosa-agar).

Para hongos del género *Boletus*, debido a su lento crecimiento en medios convencionales, varios autores han empleado medios de cultivo diferentes con resultados muy dispares. Poitou (1978) trabajando con *Boletus edulis, Boletus aereus, Boletus luteus, Boletus granulatus, Lactarius deliciosus* y *Tricholoma equestre* emplea como medios de cultivo Oddoux, Raper, Pachlewska y Malta 4%, obteniendo crecimientos aceptables y detectando exigencias nutricionales diferentes para diferentes cepas de una misma especie, lo que pone de manifiesto la dificultad de proponer un medio ideal para una especie o cepa determinada.

En cuanto al pH, generalmente los hongos micorrícicos son acidófilos, por lo que se suele ajustar la acidez del medio de cultivo después de su preparación. No hay una norma en cuanto al pH exacto. Marx (1969) recomienda ajustar el medio MMN a pH 5.5-5.7, Modess (1941) rectifica el Hagen a 4.6-4.8 y Palmer y Hacskaylo (1970) ajusta su medio a 4.5-4.7. En el resto de los medios de cultivo donde no se especifica pH no se suele ajustar a ningún valor concreto.

Torres y Honrubia (1991), realizaron ensayos en el que estudiaron *Suillus collinitus, Suillus granulatus, Rhizopogon roseolus, Rhizopogon luteolus, Amanita muscaria* y *Lactarius deliciosus*, frente a siete medios diferentes: Hagen, Raper, MMN, PDA, MMN modificado y MEA 2% (agar extracto de malta) a diferentes pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5). Obtuvieron los mejores resultados de *Suillus collinitus* con PDA; de *Suillus granulatus* con MMN (+ glucosa), Hagem y PDA; de *Rhizopogon roseolus* con MMN (+ glucosa); de *Rhizopogon luteolus* con PDA; de *Amanita muscaria* obtiene buenos valores con todos los medios utilizados, particularmente con MEA 2% y de *Lactarius deliciosus* con MEA 2%. En cuanto a los pH, en general parece no haber una correlación con el crecimiento de cualquiera de los hongos estudiados.

Para el mantenimiento de los hongos ectomicorrícicos, una vez que los cultivos puros se encuentran bien establecidos en placas Petri, si queremos evitar realizar repicados continuos, se transfieren a tubos de ensayo con medio de cultivo y se incuban a 20-25 ºC durante 7-15 días. Una vez que los nuevos cultivos alcanzan un desarrollo suficiente, se conservan a 4 ºC para constituir el banco de material fúngico. Este material hay que revitalizarlo periódicamente pasándolo nuevamente a placas Petri.

2.3. Literatura científica

P. pinaster es una especie en la que se ha estudiado con bastante detalle el comportamiento de sus poblaciones, abordando aspectos relacionados con su morfología, crecimiento, resistencia a factores externos y variabilidad geográfica de la especie. Ya en el año 1953, Molina (Molina, 1965) comenzaba un estudio sobre el comportamiento de 24 procedencias de *P. pinaster* en la zona litoral gallega ampliando estudios anteriores en que apenas aparecían representadas las razas españolas (Duff, 1928; Rol, 1933; Rycroft y Wicht, 1947 y Perry, 1949). Las variables estudiadas fueron mortalidad, altura, volumen y esbeltez del tronco. Sweet y Thulin (1962) también publicaron información, sobre el comportamiento de muchas de las procedencias ensayadas por Molina, en Nueva Zelanda. Ricardo Alía (Alía, 1989) continuó estudiando el comportamiento de 52 procedencias de *P. pinaster* que habían sido plantadas en 1967 en 6 localidades del centro de España evaluando variables como ramosidad, rectitud del fuste, volumen de madera y crecimiento medio anual.

Actualmente ha surgido un gran interés por la conservación de los recursos genéticos de algunas poblaciones que ha conducido al estudio de la variabilidad genética de algunos caracteres que influyen en la adaptación y la supervivencia de la especie (Kremer, 1994). En los últimos años el interés se ha dirigido hacia el estudio de isoenzimas, proteínas de reserva

o terpenos como mecanismo de discriminación entre poblaciones (Bernard Dagan *et al*., 1971; Destremau *et al*., 1982; Baradat y Marpeau, 1988; Petit, 1988; Petit *et al.*, 1995; Allona *et al*., 1996; Salvador *et al.*, 1996; Mariette *et al.*, 2001).

En cuanto a la investigación micorrícica, los ensayos sobre micorrización de *P. pinaster* son escasos en comparación con otras especies forestales. En 1941, Ferreira dos Santos conseguía la micorrización de *Boletus fragrans* en condiciones de síntesis en cultivo puro y en contenedor mediante la inoculación de micelio en un medio a base de avena, paja y una solución de sales minerales. En 1961, Takacs obtiene ectomicorrizas en *P. pinaster* de *Scleroderma citrinum* y *Suillus granulatus* en cultivo puro y de *Amanita phalloides*, *S. citrinum*, *S. granulatus* y *Russula sp.* en condiciones de vivero, detectando un mayor desarrollo vegetativo en las plantas micorrizadas. Mousain (Mousain *et al.,* 1977, 1979) consiguieron incrementar el desarrollo vegetativo de plantas de *P. pinaster*, inoculándolas con *P. tinctorius* y *Hebeloma cylindrosporum*, en distintos tipos de suelo y en condiciones controladas. Azevedo (Marx, 1980; Azevedo, 1982), mediante el recubrimiento de semillas de pino con inóculo obtenido a partir de un triturado de esporocarpos previamente deshidratados, demostró la compatibilidad ectomicorrícica entre *P. pinaster* y *Amanita muscaria*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon luteolus*, *Russula cianoxantha*, *S. citrinum* y *Tricholoma terreum.* Ruehle (Ruehle *et al.,* 1981) utilizó *Pisolithus tinctorius* y *Telephora terrestris* y Branzanti y Zambonelli (1987) *Hebeloma sinapizans, Laccaria bicolor, Paxillus involutus y S. granulatus* para la inoculación de *P. pinaster* en contenedor y en "microplots" en vivero, pero esta vez utilizando un inóculo miceliar producido en un sustrato de turba, vermiculita y medio nutritivo. Poitou (Poitou *et al.,* 1982, 1983) utilizó especies fúngicas comestibles como *Lactarius deliciosus, Suillus granulatus, Suillus luteus* y *Tricholoma flavovirens.*

En España, a pesar de que *P. pinaster* es una de las especies forestales más importantes, se ha dedicado poco esfuerzo al estudio de los hongos ectomicorrícicos asociados a ella. Destacan los trabajos publicados por Pera y colaboradores (Pera *et al.*, 1994, 1998), del I.R.T.A., sobre selección de hongos ectomicorrícicos asociados a *Pinus pinaster* para su uso en reforestación y, últimamente, el estudio de González Ochoa y colaboradores (González *et al.* 2003) sobre micorrización de planta de *Pinus pinaster* en vivero utilizando semilla de la región de procedencia Segura-Alcaraz.

No se han abordado, en cambio, estudios comparativos de la influencia de la micorrización sobre distintas procedencias de *P. pinaster*. En cuanto a otras especies, Wright y Ching (1962), estudiaron el efecto de diferentes procedencias de *Pseudotsuga menziesii*

sobre la formación de ectomicorrizas observando que las plantas mostraban desarrollos micorrícicos significativamente diferentes dependiendo del origen de la semilla. Last y colaboradores (Last *et al.*, 1984) detectaron diferencias en el número de carpóforos fructificados de diversos hongos dependiendo de los clones de *Betula pendula* y *B. pubescens* de que se trataran.

En *P. pinaster* se han observado diferencias morfológicas, genéticas y de comportamiento entre razas geográficas distintas. Cabe pensar que, al igual que en *P. menziesii*, también las haya en lo relativo a la compatibilidad micorrícica hongo-huésped o en su efecto sobre el desarrollo de las plantas y que ésto pudiera afectar a la adaptación de las distintas procedencias en una determinada zona.

Se ha hecho una recopilación de publicaciones científicas sobre *Pinus pinaster*, agrupándolas en grupos temáticos generales, debido a que la mayoría de las publicaciones tratan muchos aspectos diferentes que imposibilitarían su inclusión en una temática de estudio concreta (Fig. 10). Se han establecido las siguientes categorías: (1) productividad, silvicultura y calidad de la madera; (2) geografía, paisaje, ecología y conservación; (3) estudios de procedencias; (4) plagas, enfermedades, deforestación e incendios; (5) micorrizas; (6) estudios genéticos y mejora; (7) morfología y otras características de comportamiento; (8) estudios locales; (9) otros trabajos, donde destacan estudios sobre elementos nutritivos, respuesta a factores ambientales, fisiología, bioquímica, farmacología y cosmética. Se han recopilado referencias de un total de 228 artículos y publicaciones desde 1908 a 2004. Cabe destacar el escaso número de artículos sobre micorrizas de *Pinus pinaster*, sobre todo si lo comparamos con la abundancia de estudios existentes sobre otras especies como *Pseudotsuga menziesii* o *Eucaliptus spp*. Los estudios sobre procedencias de *Pinus pinaster* también son escasos pero, en cambio, son muy completos y exhaustivos, lo que proporciona una información general muy importante. Se desconocen ensayos o publicaciones que relacionen las procedencias de *Pinus pinaster* con el proceso de micorrización y su efecto sobre el árbol.

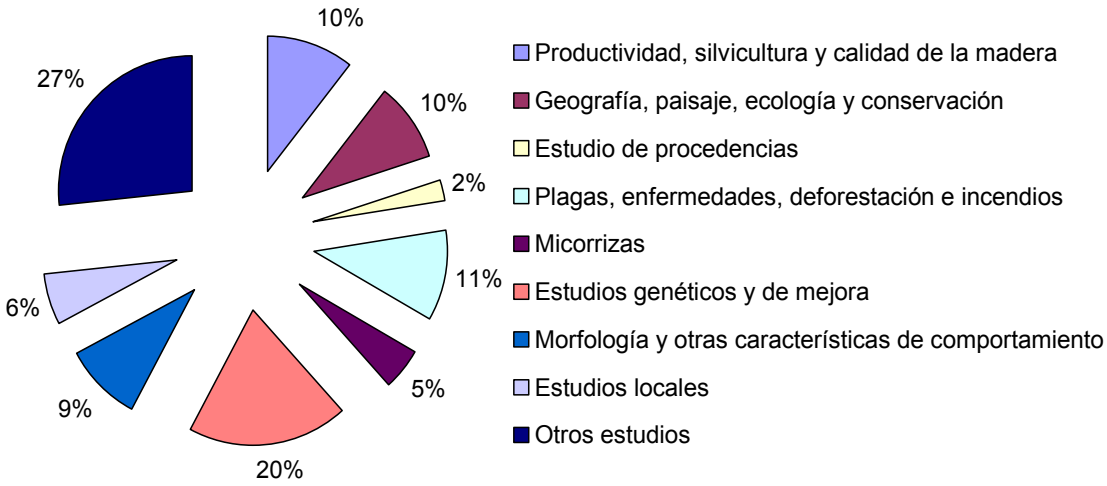


Fig. 10.- Distribución de las publicaciones científicas sobre *Pinus pinaster* clasificada por temáticas generales (desde 1908 a 2004)

3. Material y métodos

3. Material y métodos

3.1. Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro*

3.1.1. Especies y cepas seleccionadas

Se han seleccionado 5 especies y/o cepas de hongos micorrícicos. Tres de ellos, *Pisolithus tinctorius, Laccaria laccata* y *Paxillus involutus*, son especialmente interesantes debido al amplio espectro de huéspedes y a la intensa investigación que sobre ellos se ha venido desarrollando en los últimos años, acreditando una influencia positiva sobre la mayor parte de las plantas huésped en las que se ha descrito. Las cepas de *Pisolithus tinctorius* y *Laccaria laccata* fueron cedidas por el Institut de Recerca i Tecnología Agroalimentaries de Cataluña (I.R.T.A.) y la de *Paxillus involutus* fue recogida por el Centro de Investigacions Forestais e Ambientais de Lourizán (C.I.F.A.L.) y se encuentra depositada en su cepario.

Tabla 2. Características de las especies/cepas utilizadas

especie / cepa:	***Boletus badius* (Sarria)**
localidad:	Sarria (Lugo)
planta huésped:	*Quercus robur*
colección:	CIFA Lourizán
Nº aislamiento:	9699
Año:	1999
especie / cepa:	***Boletus badius* (S. Vicente)**
localidad:	S. Vicente do Mar (Pontevedra)
planta huésped:	*Pinus pinaster*
colección:	CIFA Lourizán
Nº aislamiento:	9700
Año:	2002
especie / cepa:	***Paxillus involutus***
localidad:	Lourizán (Pontevedra)
planta huésped:	*Pinus pinaster, Eucalyptus spp.*
colección:	CIFA Lourizán
Nº aislamiento:	9993
Año:	1999
especie / cepa:	***Laccaria laccata***
localidad:	Montseny (Barcelona)
planta huésped:	*Quercus ilex*
colección:	IRTA
Nº aislamiento:	270
Año:	1989
especie / cepa:	***Pisolithus tinctorius***
localidad:	Fitor (Girona)
planta huésped:	*Quercus suber*
colección:	IRTA
Nº aislamiento:	435
Año:	1994

La otra especie seleccionada, *Boletus badius*, resulta interesante por su asociación con *Pinus pinaster* en estado juvenil, por la alta frecuencia con la que se encuentra en los bosques gallegos y, sobre todo, por sus características gastronómicas, que la hacen una seta muy interesante desde el punto de vista comercial.

Una de las cepas de *Boletus badius* seleccionadas había sido recogida por el C.I.F.A.L. en Sarria (Lugo) en 1999. Con el fin de obtener una mayor variedad de aislamientos de *Boletus badius*, particularmente de cepas provenientes de carpóforos recogidos en parcelas de *Pinus pinaster* , se realizaron muestreos de una forma sistemática y durante todas las épocas de los años 2002 y 2003, pero con mayor intensidad en los meses de

otoño de 2002, en plantaciones forestales de *Pinus pinaster* de diferentes localidades del interior y de la costa gallega. Se recogían ejemplares jóvenes de carpóforos, 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 su identificación exacta.

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 de micelio de esporocarpo (2-5 mm^3 de tamaño) a las placas Petri, con medio de cultivo Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969) autoclavado a 120 ºC durante 15 minutos. Los ejemplares, a partir de los que se habían realizado aislamientos, se secaban a una temperatura de 40-50 ºC durante 3-4 días en una estufa de desecación por aire forzado, y se conservaban en la micoteca del C.I.F.A.L. como especímenes de herbario para posteriores comprobaciones y confirmaciones taxonómicas.

Los cultivos se mantenían en cámara de cultivo a 25 ºC de temperatura. Los aislamientos realizados con éxito se repicaban a las pocas semanas, repicado de purificación, a nuevas placas Petri. Las cepas se mantuvieron en placas Petri, realizando los repicados necesarios, hasta el momento de su utilización en el ensayo.

Durante el año 2002 se consiguieron aislar con éxito dos cepas de *Boletus badius*, una procedente de A Barrela (Lugo), en el interior de Galicia, número de aislamiento 9702, y otra procedente de la costa, de San Vicente do Mar (Pontevedra), aislamiento número 9700, ambas asociadas a *Pinus pinaster*. Para el actual ensayo de medios de cultivo se desestimó la cepa procedente del interior (9702) debido a que su crecimiento en cultivo puro era menos vigoroso que el de la cepa de la costa (9700) y la de Sarria (9699).

En la Tabla 2 se muestran las características de cada una de las especies/cepas: localidad, planta huésped, entidad donde se encuentra depositada, número de aislamiento y año de recolección.

3.1.2. Medios de cultivo y pH

Se han seleccionado para este ensayo cuatro de los medios de cultivo más utilizados, debido a sus buenos resultados con una amplia gama de hongos ectomicorrícicos.

Los medios seleccionados son:

- MMN (Marx, 1969)

- Raper (Raper y Raper, 1972)
- Agar-malta 4%
- PDA (patata-dextrosa agar)

MMN es el más utilizado y suele ofrecer buenos resultados con la mayoría de los hongos ectomicorrícicos (Marx, 1969; Molina y Palmer, 1982). Raper y Agar-malta han dado buenos crecimientos con diversas cepas del género *Boletus* (Poitou, 1978). En el Centro de Investigacions Forestais e Ambientais de Lourizán (C.I.F.A.L.) se aisla *Boletus badius* con éxito en Agar-malta y MMN dando el primero un medio de conservación de larga duración. PDA se ha revelado como un medio de cultivo excelente en cepas del género *Suillus* (Torres y Honrubia, 1991).

En la tabla 3 se describe la composición de cada uno de los medios de cultivo seleccionados.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados en el ensayo

	MMN	Raper	Malta 4%	PDA
Peptona		2,0 g		
Extr. De levadura		2,0 g		
extracto de malta	3,0 g			
d-Glucosa	10,0 g			
Malta			40,0 g	
Glucosa		20, 0 g		
$(NH_4)_2HPO_4$	0,25 g			
KH_2PO_4	0,5 g	0,46 g		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,15 g	0,5 g		
$CaCl_2$	0,05			
$FeCl_3$	1,2 ml			
	(1% solución)			
NaCl	0,025 g			
PO_4HK_2		1 g		
Tiamina	100 mg			
Patata				4,0 g
Dextrosa				20,0 g
H_2O destilada	hasta 1000 ml			
Agar		10,0 g	15, 0 g	15, 0 g
pH después autoclave	5.5-5.7	7	5	5,5

En los trabajos de aislamiento y propagación de hongos micorrícicos realizados en el C.I.F.A.L. se venía observando una respuesta diferencial en el crecimiento de algunas especies a diferentes pH del medio. Por esta razón dentro de cada medio se seleccionó un rango de pH con una desviación de medio punto entorno al pH recomendado

Tabla 4. Combinación de pH y medios de cultivo ensayados

Medio de cultivo	pH						
	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
Raper							
MMN							
AM							
PDA							

en cada caso. Todos los pH fueron corregidos con ácido clorhídrico o hidróxido sódico antes de la esterilización. En la tabla 4 se muestran los pH ensayados en cada medio.

3.1.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con 60 tratamientos (combinación de 5 hongos, 4 medios y 3 pH) y 6 repeticiones por tratamiento.

Se calculó el radio medio de la colonia de las 6 repeticiones para cada una de las fechas de toma de datos. Los datos así obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza (SAS Institute, 1999), utilizando el test de Duncan para la comparación de medias (P=0,05).

El análisis estadístico se realizó para los cinco hongos por separado en cada una de las fechas, estudiando la influencia del pH en cada medio de cultivo y la influencia del medio de cultivo y la combinación medio de cultivo-pH sobre el radio medio de la colonia. No se investigó la influencia del pH sobre cada hongo debido a que se usaron diferentes pH para cada medio de cultivo.

El modelo de análisis de varianza utilizado fue un experimento factorial de 2 factores que responde al siguiente cuadro:

Tabla 5.- Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado en el ensayo de medios de cultivo y pH en laboratorio

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
medio de cultivo	3
pH	2
medio de cultivo * pH	6

3.1.4. Descripción del ensayo

Para la realización del ensayo se partió de colonias ya establecidas en placas Petri en medio MMN y cultivadas a 25 ºC. Dos meses antes del comienzo del ensayo se replicaron las cepas más lentas, ambas cepas de *Boletus badius* y *Laccaria laccata*, en 10 placas Petri con el propósito de tener una cantidad suficiente de inóculo en el momento del ensayo, y un mes antes del ensayo las cepas más rápidas: *Paxillus involutus* y *Pisolithus tinctorius*.

Durante la semana del 7 al 11 de abril de 2003 se preparó el medio de cultivo necesario y se dispensó en las placas Petri para su siembra.

Una vez preparado el medio de cultivo y rectificado el pH mediante ácido clorhídrico o hidróxido sódico, se esterilizaba a 120 ºC durante 15 minutos y a continuación se llenaban

las placas Petri de forma aséptica en la cámara de flujo laminar. Las placas Petri utilizadas fueron de 8,5 cm de diámetro y contenían 20 ml de medio cada una. Se llenaron un total de 50 placas Petri por cada combinación de medio de cultivo-pH, haciendo un total de 600 placas.

A continuación, una vez preparadas todas las placas, en la cámara de flujo laminar se procedió a su inoculación con discos de 8 mm de diámetro recogidos del borde de zonas de crecimiento activo de las colonias previamente incubadas, cerrándolas a continuación con "Parafilm". De cada aislamiento, medio y pH se prepararon diez placas, seis de las cuales se utilizarían para el ensayo de crecimiento y las cuatro restantes para la descripción morfológica de las colonias con el fin de poderlas manipular con cierta libertad sin que afectara a su crecimiento.

3.1.5. Control de los ensayos

El control de los datos de crecimiento se realizó a los 7, 14, 23, 29, 37, 44, 50, 57, 68, 77, 85 y 90 días del comienzo del ensayo. La dimensión de las colonias se determinó calculando la media de los 4 radios de las colonias en las fechas correspondientes. Para ello, las placas destinadas al estudio del crecimiento (6 por tratamiento) fueron marcadas con un eje de coordenadas con el fin de tomar periódicamente las medidas de los 4 radios de la colonia, en milímetros, hasta un total de 12 controles, durante 3 meses (Foto 5).

También se realizaron descripciones morfológicas de las colonias a los 15, 30 y 45 días atendiendo a criterios de textura del micelio, borde de las colonias, pigmentación del medio, coloración del mismo, por el anverso y el reverso de la placa, etc. El color se caracterizó mediante la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS Colour Chart) que posee un total de 808 colores diferentes (Foto 6).

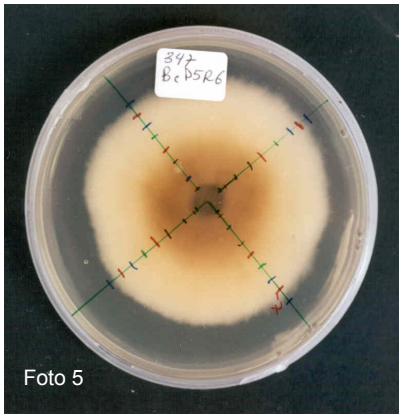


Foto 5

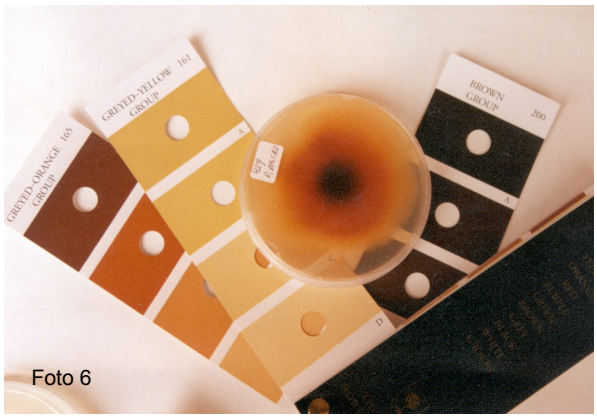


Foto 6

Foto 5.- Placa 347 BcP5R6, *Boletus badius* (S. Vicente), en PDA a pH 5,0 con el eje de coordenadas y las marcas de crecimiento en cada una de las fechas de la toma de datos.

Foto 6.- Placa 429 PiM5.5A2, *Paxillus involutus*, en MMN a pH 5,5, muestra utilizada para la descripción morfológica, junto con la carta de colores (RHS).

3.2. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton sembrados en suelo e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*

3.2.1. Orígenes de *Pinus pinaster* ensayados

La selección del material vegetal a ensayar se hizo de forma que estuvieran representadas las tres grupos de *P. pinaster* existentes en España, según Baradat y Marpeau (1988): Atlántico, Perimediterráneo y Maghrebí. En cuanto a la región Noroeste, se decidió escoger un tipo peculiar de *Pinus pinaster* existente en el sur de Galicia, localizado en la provincia de Pontevedra, con unas características propias de corteza, fuste y crecimiento, conocido vulgarmente como "pino femia" o "piñeiro femia".

Las regiones de procedencia selecionadas fueron las siguientes:

- Noroeste Interior, "pino femia" (Atlántico)
- Sierra de Oña (Atlántico)
- Sierra de Gredos (Atlántico)
- Meseta Castellana (Atlántico)
- Serranía de Cuenca (Perimediterráneo)
- Sierras de Segura-Alcaraz (Perimediterráneo)
- Sierra Bermeja (Maghrebí)

Todos los lotes, excepto la semilla de pino "femia", fueron suministrados por el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", Guadalajara, dependiente del Ministerio de Medio Ambiente. Las semillas de "pino femia" procedían de un ejemplar aislado situado en el pueblo de Taboazas, Sierra do Suído, en la provincia de Ourense, que había sido localizado con anterioridad y que en abril de 2003 apareció talado. Se recogieron las piñas y se mantuvieron en el sequero del Centro de Investigación Forestal y Ambiental de Lourizán (C.I.F.A.L.) hasta su eclosión. Todas las semillas se conservaron en frío hasta el momento de la siembra o de la estratificación.

Todos los lotes de semillas fueron sometidos a un test de germinación y se tomaron datos de peso específico y pureza. Las características oficiales de los lotes y los resultados obtenidos por los tests realizados están reflejados en la tabla 6.

Tabla 6.- Características de las semillas ensayadas (MFRI.- material forestal de reproducción identificado; MFRS.- material forestal de reproducción seleccionado; Germ.- % germinación en etiqueta; P.1000.- peso en gramos de 1.000 semillas en etiqueta; *.- resultados obtenidos de los lotes utilizados en el ensayo.

Origen	Tipo	Nº lote	Cosecha	Germ.	*Germ.	Pureza	*Pureza	P. 1000	*P. 1000
Noroeste, "femia"			2002-03		75,1		99,6		70,70
Sierra de Oña	MFRI	2043a	1998-99	72,0	74,0	98,9	98,9	49,39	51,30
Sierra de Gredos	MFRI	2175	1999-00		66,9		99,2		52,00
Meseta Castellana	MFRI	2047b	1998-99	74,0	78,2	99,5	99,5	63,11	63,30
Serranía de Cuenca	MFRI	2050a	1998-99	80,0	76,2	99,6	99,5	50,10	54,70
Segura-Alcaraz	MFRS	2281a	2000-01	92,0	87,1	99,6	99,6	66,60	65,31
Sierra Bermeja	MFRI	430	1989-90	78,0	62,4	99,5	99,5	69,49	67,31

3.2.2. Elección de las cepas/especies ectomicorrícicas

Con el fin de probar diferentes métodos de inoculación, se decidió utilizar un inóculo miceliar y otro esporal. Tras el ensayo previo sobre la influencia del medio de cultivo y el pH sobre la producción de inóculo de hongos ectomicorrícicos ("Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro*"), se decidió utilizar la cepa 9.993 de *Paxillus involutus*, como inóculo miceliar, por ser la que mejor resultado ofreció en su cultivo *in vitro* y por ser una especie muy cosmopolita. El *Pisolithus tinctorius* se seleccionó debido a la facilidad de lograr grandes cantidades de inóculo esporal y porque es un hongo que ha ofrecido buenos resultados en un gran número de ensayos (Ruehle, 1982; Pera *et al.*, 1994; Torres y Honrubia, 1994; Niemi *et al.*, 2004). Todos los carpóforos fueron recolectados en verano-otoño de 2003 en terrenos del C.I.F.A.L. sobre suelos de bosques mixtos.

3.2.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en parcela subdividida ("split-plot"), con 4 repeticiones. La parcelas principales fueron los inóculos (inóculo esporal de *Pisolithus tinctorius*, inóculo miceliar de *Paxillus involutus* y control) y las subparcelas estuvieron formadas por los distintos orígenes de *Pinus pinaster* (Sierra Bermeja, Serranía de Cuenca, Sierras de Segura-Alcaraz, Sierra de Gredos, Meseta Castellana, Sierra de Oña y "pino femia" de Noroeste Interior). La combinación de los dos tipos de inóculos y el control con los siete orígenes de semilla, hacían un total de 21 tratamientos diferentes.

Al final del ensayo se muestrearon 12 plantas por tratamiento, aunque en algunos tratamientos no se alcanzó esta cifra debido a la escasa tasa supervivencia de algunas subparcelas. Cuando no se disponía de observaciones suficientes debido al elevado número de marras, se estimó el dato mediante la fórmula de estimación de datos perdidos para un diseño en

parcelas subdivididas (Cochran y Cox, 1991)[1]. Se tomaron datos de peso verde, peso seco y altura de la parte aérea, porcentaje de micorrización total y de los diferentes morfotipos y supervivencia de plantas al final del ensayo.

Todos los datos (peso seco de la parte aérea, longitud de la parte aérea, porcentaje de supervivencia, porcentaje de germinación total y porcentaje de micorrización por morfotipos, estos tres últimos corregidos por la transformación arcoseno[2]) se sometieron a un análisis de varianza (SAS Institute, 1999) utilizando el test de Duncan para la comparación de medias (P=0,05).

El modelo de análisis de varianza utilizado fue un experimento en parcelas subdivididas (split-plot) que responde al siguiente cuadro:

Tabla 7.- Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado en el ensayo de orígenes (procedencias) en suelo

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
parcela	3
inóculo	2
parcela * inóculo	6
origen semilla	6
inóculo * origen semilla	12
error	54

3.2.4. Localización y duración del ensayo

El ensayo se desarrolló en la localidad de Lourizán, ayuntamiento de Pontevedra, provincia de Pontevedra, en una parcela perteneciente al C.I.F.A.L.

La siembra comenzó el día 9 de noviembre de 2003 y el último muestreo se realizó el 5 de julio de 2004.

3.2.5. Características climáticas de la zona del ensayo

A continuación se muestran los datos climáticos de la zona de ensayo para un periodo de 30 años tomados en la estación meteorológica de Lourizán.

[1] La ausencia de observaciones se estimó mediante la fórmula de estimación de datos perdidos para un diseño en parcelas subdivididas:

$$Y = [\, rW + b\,(a_j b_k) - (a_j)\,] \,/\, [\,(r-1)\,(b-1)\,]$$

Donde:
- r, número de bloques de la procedencia donde falta
- b, número de subparcelas de la parcela donde falta
- W, total de las subparcelas observadas de la parcela donde falta
- $(a_j b_k)$, total observado del tratamiento que falta
- (a_j), total observado de las parcelas que recibieron en el nivel j de A

[2] La transformación arcoseno es especialmente apropiada para porcentajes y proporciones, en particular cuando los datos sobrepasan el intervalo entre 30 % y 70 % (Sokal y Rohlf, 1984). La transformación halla $\theta = \text{arcsen}\,(p)^{1/2}$, donde *p* es el porcentaje en tanto por uno.

Estación meteorológica: Lourizán – Pontevedra

Latitud: 42º 33'

Longitud: 8º 33'

Altitud: 60 m

Periodo: 30 años

La zona de ensayo, según la clasificación climática de Allué (1966), pertenece a la región fitoclimática *Atlántico europeo* V(VI) y según Thornthwaite (1948), pertenecería a un clima *A s B_2' a'*.

Tabla 8.- Tabla resumen de los datos climáticos de Lourizán de un periodo de 30 años. t.- temperatura media (ºC); t_m.- temperatura media de las mínimas (ºC); t_M.- temperatura media de las máximas (ºC); T_m.- temperatura media de las mínimas absolutas (ºC); T_M.- temperatura media de las máximas absolutas (ºC); P.- precipitación (mm); ETP.- evapotranspiración potencial (mm)

	en	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	med. an.
t	9,3	9,9	11,6	12,6	16,0	18,2	19,4	19,3	18,2	14,8	11,0	9,8	14,2
tm	5,1	5,4	7,3	7,9	11,2	13,0	14,2	14,1	13,7	10,3	6,9	6,3	9,6
tM	13,5	14,4	16,0	17,4	20,7	23,4	24,6	24,6	22,7	19,4	15,1	13,3	18,7
Tm	-0,7	0,6	1,8	3,1	6,6	8,6	9,9	9,8	9,4	5,5	1,3	0,5	4,7
TM	18,1	20,9	22,6	24,0	29,5	31,6	32,2	32,3	29,6	24,7	20,6	17,2	25,3
P	193	199	217	141	115	59	24	56	107	197	228	265	1.800
ETP	19	29	58	77	108	130	146	111	55	45	15	15	807

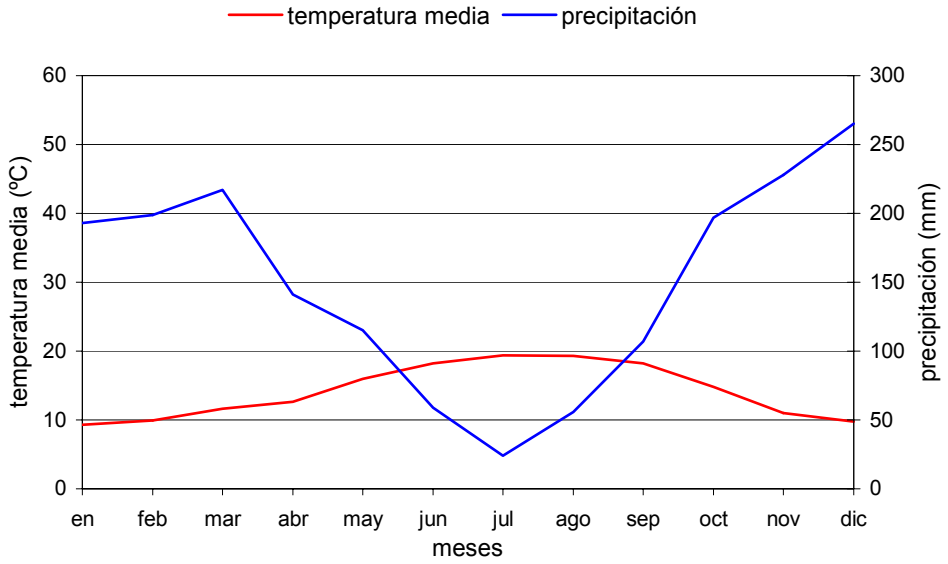


Fig. 11.- Diagrama de Gaussen de Lourizán-Pontevedra

3.2.6. Condiciones climáticas durante el periodo de ensayo

Los datos climáticos diarios fueron facilitados por la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia, obtenidos de la estación meteorológica de Lourizán - Pontevedra, situada a escasos 50 metros de la parcela de ensayo.

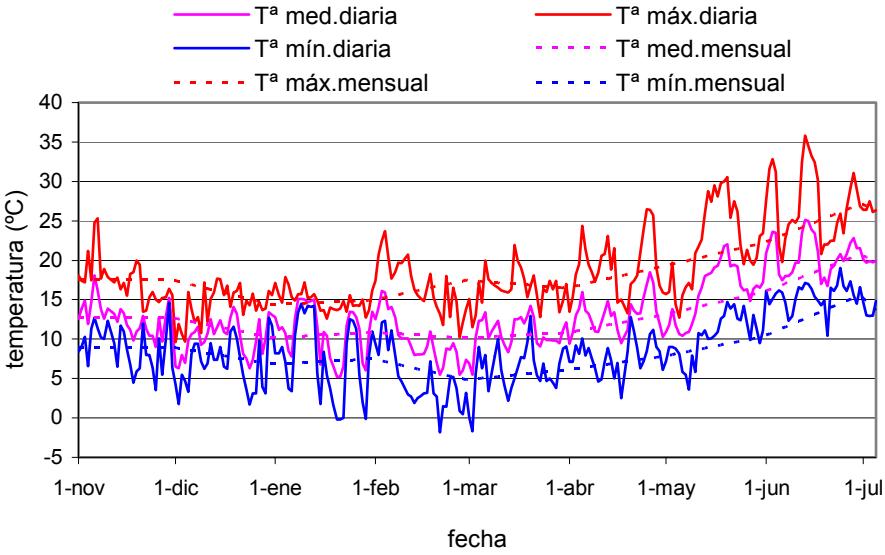


Fig. 12.- Variación de las temperaturas en la parcela durante el periodo de ensayo (desde el 9 de noviembre de 2003 al 5 de julio de 2004)

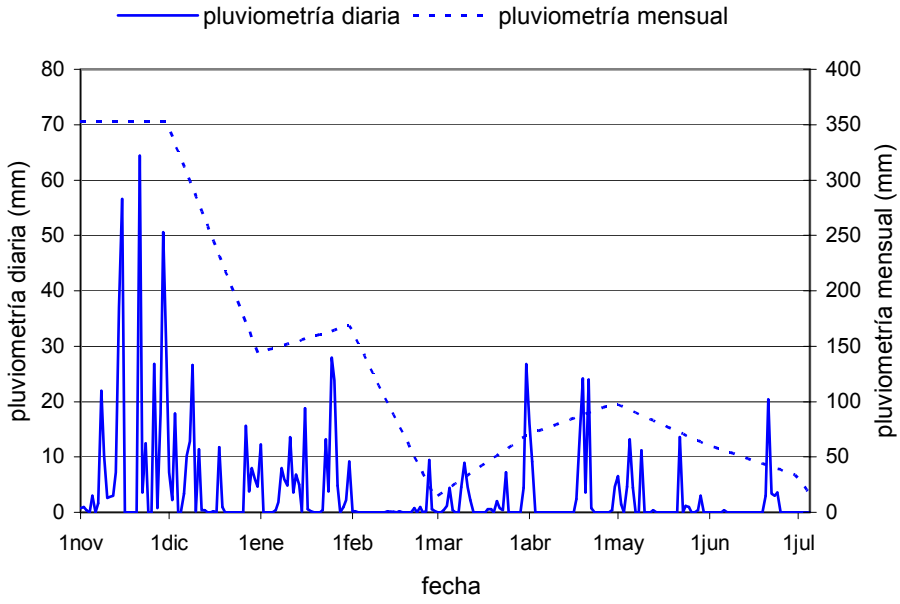


Fig. 13.- Variación de la precipitación en la parcela durante el periodo de ensayo (desde el 9 de noviembre de 2003 al 5 de julio de 2004)

En las figuras 12 y 13 se facilitan las gráficas de los datos diarios y mensuales de las temperaturas máximas, mínimas y medias y la pluviometría durante el periodo del ensayo, desde el 9 de noviembre de 2003 hasta el 5 de julio de 2004.

3.2.7. Características edafológicas de la parcela de ensayo

La parcela donde se desarrolló el ensayo es un terreno de monte, inculto desde hace años, y que en los momentos previos a la preparación del terreno se encontraba cubierto fundamentalmente de gramíneas espontáneas.

Para el análisis físico-químico del suelo, se tomaron diversas muestras de suelo distribuídas al azar en los bancales de siembra hasta una profundidad de 25 cm. Los resultados obtenidos se exponen a continuación:

Textura franca		
pH en H_20, relación 1:2,5	5,14	fuertemente ácido
pH en Cl	4,29	fuertemente ácido
% C	1,62	normal
Nitrógeno total (%)	0,117	normal
P (mg/kg) (Olsen)	21,87	normal
Ca (cmol/kg) (ac. amónico)	1,454	muy bajo
Mg (cmol/kg) (ac. amónico)	0,337	bajo
K (cmol/kg)	0,246	bajo
Na (cmol/kg)	0,337	normal
Al (cmol/kg)	0,847	

Los niveles nutricionales se mantuvieron en las condiciones originales sin incorporar ningún tipo de fertilizante o enmienda con el fin de mantener las condiciones normales del suelo y no interferir en la simbiosis micorrícica.

3.2.8. Preparación del inóculo

Para la producción del inóculo miceliar se preparó un medio de cultivo sólido en base a 57,93 % de vermiculita (grado 3), 4,14 % de turba tamizada y 37,93 % de medio Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969) rectificado a un pH de 5,5 mediante ClH. Se llenaron un total de 31 botes de cristal de 240 cc de capacidad con 200 cc del medio MMN en turba-vermiculita mencionado y se introdujeron en el autoclave a una temperatura de 120 ºC durante 60 minutos. A continuación, una vez enfriados, cada bote se inoculaba asépticamente, en la cámara de flujo laminar, con 6 discos de 8 mm de diámetro procedentes de cultivos puros del hongo desarrollados en placas petri con medio de cultivo Melin-Norkrans modificado

(MMN). Todos los botes se cerraron con su tapa, se sellaron con parafilm y se incubaron durante tres meses en cámara de cultivo en total oscuridad y a 25 ºC de temperatura hasta conseguir la colonización total del medio de cultivo.

Para la preparación del inóculo esporal, se recogieron esporocarpos de *Pisolithus tinctorius* durante el verano y el otoño del año 2003 en las plantaciones forestales del C.I.F.A.L. y se desecaron a temperatura ambiente. Una vez deshidratados se conservaron en botes de plástico a temperatura ambiente hasta su utilización. Las esporas se recogieron tamizando el esporocarpo desecado por un tamiz de 0,5 mm de poro (Marx y Bryan, 1975). De la masa de esporas recogidas, se tomó 0,1 g y se suspendió en 250 ml de agua con cinco gotas de Tween 20, con el fin de determinar la concentración de esporas por recuento directo al microscopio en un hematocitómetro dando un total de $2.398 \cdot 10^6$ esporas por gramo.

Foto 7.- Inóculo de *Paxillus involutus* en medio de turba-vermiculita

3.2.9. Preparación del terreno y siembra

La preparación del terreno consistió en un pase cruzado de rotovator y una cava manual con el fin de modelar el terreno y formar 12 bancales de siembra de 6,30 m x 1,20 cada uno, agrupados en 4 bloques, a razón de tres bancales por bloque. Cada bancal se dividió en 7 subparcelas de dimensiones 1,20 m x 0,90 m, una por cada origen de semilla utilizada.

Foto 8.- Parcela de ensayo

Las semillas se pusieron a remojo durante 24 horas y posteriormente se desinfectaron sumergiéndolas durante 1 hora en una solución de 2 gramos de thiram 80 % por litro de agua. Se sumergían 200 g de semilla en 285 cc de disolución. Después del tratamiento, una vez escurridas, se mantuvieron en cámara fría a 4 ºC hasta el momento de la siembra que tuvo lugar entre los días 9 y 11 de noviembre de 2003.

La inoculación se realizó de diferente forma según el inóculo utilizado. El inóculo de *Paxillus involutus* en medio de cultivo turba-vermiculita se aplicaba en el hoyo en el mismo momento de la siembra, a razón de 2 cc por semilla con la precaución de que la semilla quedara perfectamente en contacto con el inóculo. La inoculación con basidiosporas de *Pisolitus tinctorius* se llevó a cabo antes de la siembra mezclando 50 g de semilla húmeda de cada origen con 2,9 g de esporas, quedando las semillas completamente cubiertas de basidiosporas.

La dosis de siembra fue de 250 semillas por metro cuadrado, con un marco de siembra de 4 cm x 10 cm. Para que las semillas quedaran perfectamente distribuídas tras la siembra se fabricaron unos moldes de madera de las mismas dimensiones que las subparcelas, agujereadas uniformemente formando 7 líneas a 10 cm de distancia entre ellas, con 25 agujeros cada una, separados 4 cm. La siembra se realizó manualmente utilizando las plantillas de madera agujereadas como marco de siembra. Cada subparcela estaba constituída por 7 líneas de 25 semillas cada una, lo que hacía un total de 175 semillas por subparcela o tratamiento. Las semillas se sembraban a una profundidad de 1 cm a razón de 1 semilla por hoyo. A continuación se utilizó arena como cubresiembras aplicando una capa de 1 cm de altura.

Foto 9.- Detalle de las plántulas de pino

Debido a que todo el ensayo se desarrolló a la intemperie hubo ciertas vicisitudes climáticas y sanitarias que afectaron notablemente al ensayo y que repercutieron negativamente en la supervivencia de las plantas. El problema más grave ocurrido fue un ataque de rosquilla negra que tuvo lugar a mediados de enero, por lo que se aplicó carbofurano 5 % granulado a razón de 15 kg por hectárea. Los bancales sufrieron además cierto desperfecto, debido al pisoteo de un jabalí, que no tuvo mayores consecuencias para el ensayo.

Posteriormente, durante todo el periodo de duración del ensayo se realizaron trabajos de mantenimiento periódicos consistentes en escardas manuales, limpieza de calles y remodelado de los bancales.

3.2.10. Control de los ensayos

Al final del ensayo, el 5 de julio de 2004, se levantaron 12 plántulas elegidas al azar en cada subparcela aunque, debido a la elevada mortalidad, en alguna de ellas hubo que coger un número inferior. El muestreo de las plantas se hizo extrayendo un cepellón prismático de 12 cm

de lado y 15 cm de profundidad con ayuda de una laya. A continuación se cortaba la parte aérea al nivel del suelo y se tomaban datos del peso verde y de su altura y se introducían en sobres etiquetados. Los cepellones se lavaban bajo un suave chorro de agua corriente sobre un tamiz de 5 mm, se introducían en botes perfectamente etiquetados y se llenaban con una mezcla al 75 % de etanol y 25 % de agua para su perfecta conservación. Las partes aéreas tras desecarlas en una estufa a 70 ºC durante 48 horas, momento en el que ya habían alcanzado el peso seco constante, se pesaban en una balanza de precisión, de hasta cuatro decimales de gramo. Las muestras de raíz se sumergían en una disolución de metafosfato de sodio al 1% en peso, removiendo y dejando reposar durante 24 horas (de Román y de Miguel, 2000) con el fin de facilitar la disgregación del suelo.

3.2.11. Análisis de laboratorio

Una vez en el laboratorio, cada muestra de raíz se analizaba íntegramente bajo la lupa binocular a la búsqueda de los diferentes morfotipos y para el cálculo del porcentaje de micorrización, que se llevó a cabo contando la totalidad de sus ápices.

Cada micorriza presumiblemente diferente se guardaba en viales con FAA (mezcla de 66,6 % de alcohol etílico, 5,0 % de ácido acético puro, 5,0 % de formol y 23,4 % de agua destilada) (Giraud, 1988), con el fin de que se mantuvieran en perfectas condiciones hasta su posterior análisis más minucioso y como conservación de los holotipos para posibles revisiones futuras.

Foto 10.- Extracción de las muestras

Una vez terminado el recuento, todas las micorrizas, en principio diferentes, conservadas en los viales, se sometieron a un análisis más prolijo, haciendo cortes y observando las estructuras diferenciadoras (manto, rizomorfos, hifas, cistidios, etc) al microscopio,

agrupando aquellos morfotipos que se habían considerado diferentes en una misma clase cuando las características microscópicas así lo evidenciaran.

La descripción de las micorrizas se realizó siguiendo las pautas establecidas por Agerer (1994). De cada morfotipo se anotaban las siguientes características:

- sistema micorrícico: longitud y tipo de ramificación
- eje principal: diámetro
- terminaciones no ramificadas: forma, longitud, diámetro y color
- superficie de las terminaciones no ramificadas
- abundancia de las hifas que emanan
- rizomorfos: abundancia, color, forma de conexión con el manto
- manto: tipo y color
- cistidios: abundancia, forma y dimensiones

3.3. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* sembrados en contenedor utilizando técnicas convencionales de propagación de planta forestal e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*

3.3.1. Orígenes de *Pinus pinaster* ensayados

Los orígenes de *Pinus pinaster* utilizados en este ensayo fueron los mismos del Epígrafe 3.2.1. "Orígenes de *Pinus pinaster* ensayados".

3.3.2. Elección de las cepas/especies ectomicorrícicas

Al igual que el material vegetal, las cepas/especies de hongos ectomicorrícicos utilizados en este ensayo fueron los mismos que en el Epígrafe 3.2.2. "Elección de las cepas/especies ectomicorrícicas".

3.3.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un experimento factorial con 3 niveles del factor inóculo y 7 niveles del factor origen (procedencias) dando un total de 21 tratamientos diferentes. Cada tratamiento se distribuyó en dos bandejas de 48 alveolos, resultando un total de 96 plantas por tratamiento. Las bandejas se situaron en el interior del invernadero con una distribución completamente aleatorizada. La misma distribución se conservó cuando el ensayo se trasladó a su emplazamiento definitivo en el exterior.

Se tomaron datos semanales del porcentaje de germinación de la totalidad del espacio muestral. Los datos quincenales de longitud de la parte aérea se determinaron sobre una muestra de 24 plantas seleccionadas al azar para cada tratamiento. Los datos finales de peso seco, peso verde y altura de la parte aérea, peso seco del sistema radicular, porcentaje de micorrización total y de los diferentes morfotipos hallados se determinaron de una muestra de 20 plantas seleccionadas al azar para cada tratamiento.

Los datos de porcentaje de germinación se analizaron separadamente para cada fecha al igual que los datos de altura. En la tabla 9 se indica el análisis de varianza utilizado en los porcentajes de germinación.

En cuando al incremento quincenal de la altura, los grados de libertad varían respecto a los porcentajes de germinación ya que la muestra fue de 24 plantas por tratamiento en lugar de 96 (tabla 10).

Tabla 9.- Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado para los porcentajes de germinación en el ensayo de orígenes (procedencias) en contenedor

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
origen semilla	6
error	35

Tabla 10.- Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado para los incrementos quincenales de la altura en el ensayo de orígenes (procedencias) en contenedor

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
inóculo	2
origen semilla	6
inóculo * origen semilla	12
error	483

Para los datos finales de longitud y peso seco de la parte aérea, peso seco de las raíces, peso seco de la planta, relación del peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz, relación de la longitud y el peso seco de la parte aérea, porcentaje de micorrización total y porcentaje de cada uno de los morfotipos se utilizó el análisis de varianza que se indica en la tabla 11:

Tabla 11.- Fuentes de variación y grados de libertad del modelo empleado para los datos finales en el ensayo de orígenes (procedencias) en contenedor

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
inóculo	2
origen semilla	6
inóculo * origen semilla	12
error	399

En todos los casos los datos expresados en porcentaje (%) fueron transformados mediante la función arcseno como se explicó en el epígrafe 3.2.3. "Diseño experimental y análisis estadístico".

Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (SAS Institute, 1999), utilizando el test de Duncan para la comparación de medias (P=0,05).

3.3.4. Localización y duración del ensayo

El ensayo se desarrolló en las instalaciones que Viveros Forestales Mañente posee en la localidad de Mañente, ayuntamiento de Foz, en la provincia de Lugo.

El ensayo duró desde el 18 de marzo de 2004, día en que se realizó la siembra, hasta el 30 julio de 2004, día del muestreo final. Constó de dos fases, la primera, de cultivo protegido bajo invernadero, desde el 18 de marzo hasta el 9 de junio, y, la segunda, de cultivo en el exterior, desde el 9 de junio hasta el final del ensayo.

3.3.5. Características climáticas de la zona del ensayo

A continuación se exponen las características climáticas de la estación meteorológica más cercana a la zona de ensayo. El periodo de toma de datos es escaso, 10 años, pero se ha considerado el más apropiado debido a la cercanía al vivero (9 km). La siguiente estación meteorológica más cercana (Pedro Murias) no disponía de datos con antigüedad suficiente para que resultaran representativos.

Situación: San Pedro de Benquerencia

Latitud: 43º 33' N

Longitud: 7º 12' W

Altitud: 25 m

Tabla 12.- Tabla resumen de los datos climáticos de Benquerencia de un periodo de 10 años. t.- temperatura media (ºC); t_m.- temperatura media de las mínimas (ºC); t_M.- temperatura media de las máximas (ºC); P.- precipitación (mm)

	en	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	med.an.
t	9,4	9,4	11	11,7	13,7	16,6	18,9	19,2	18,1	15	12,3	10,6	13,9
tm	5,7	5,5	7,5	8,4	10,4	13,6	16	15,8	14,5	11,5	8,7	7,2	10,8
tM	13,1	13,4	14,5	14,9	16,9	19,4	21,7	22,5	21,6	18,5	15,9	13,9	17
P	112	109	81	114	79	59	29	39	47	135	106	103	1052

La zona de ensayo, según la clasificación climática de Allué (1966), pertenece a la región fitoclimática *Atlántico europeo* V(VI) y según Thornthwaite (1948), pertenecería a un clima B_3 *r* B_1*' a'*.

3.3.6. Condiciones climáticas durante el periodo de ensayo

Entre el 2 de abril y el 9 de junio, periodo en el que las plantas se mantuvieron bajo abrigo, se tomaron datos diarios de temperatura máxima y mínima en el interior del invernadero (Fig. 14).

A partir del 9 de junio, momento en el que el ensayo se trasladó al exterior y hasta la finalización del ensayo, la información climática diaria fue facilitada por la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia de datos tomados en la estación meteorológica Pedro Murias, situada en Vilaframil (Ribadeo) a 18 kilómetros del vivero, por ser la estación meteorológica más cercana a la zona de ensayo con datos climatológicos diarios (Fig. 15).

A continuación se facilitan las gráficas de la variación de temperatura en el interior (Fig. 14) y en el exterior del invernadero (Fig. 15) en cada una de las fases del periodo de ensayo.

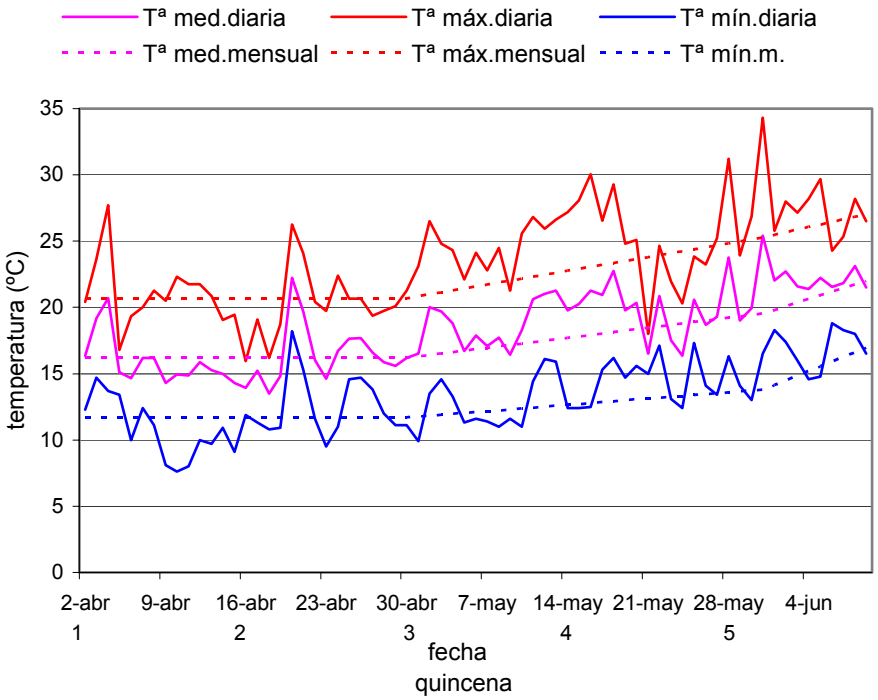


Fig. 14.- Variación de la temperatura media, máxima y mínima, diaria y mensual, en el interior del invernadero desde el 2 de abril al 9 de junio de 200

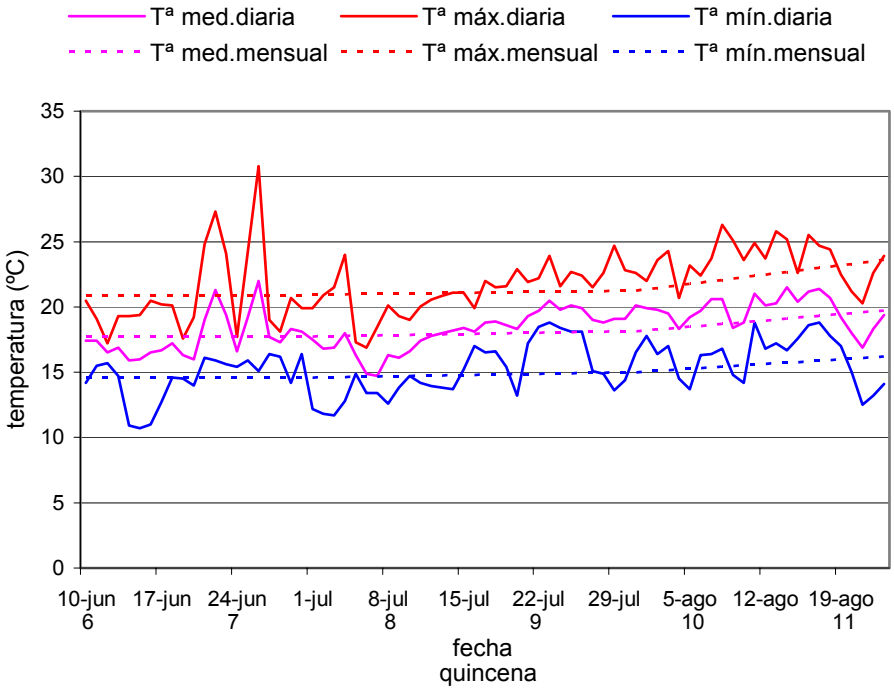


Fig. 15.- Variación de la temperatura media, máxima y mínima, diaria y mensual, en el exterior (Observatorio de Pedro Muruais, Ribadeo) desde el 9 de junio hasta el 26 de agosto de 2004

3.3.7. Preparación del inóculo

El proceso utilizado en la preparación del inóculo de *Paxillus involutus* y *Pisolithus tinctorius*, fue el mismo que el del ensayo en suelo (Epígrafe 3.2.8. "Preparación del inóculo").

3.3.8. Preparación de la siembra

El proceso de producción, técnicas y materiales utilizados en el ensayo intentaron reproducir en todo momento el proceso productivo comercial de Viveros Forestales Mañente, aunque se hicieron una serie de modificaciones para conseguir unas mejores condiciones del ensayo:

- las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas durante una hora en una disolución de 2 g/l de thiram (80 % pp) y posteriormente se estratificaron en arena húmeda a 4 ºC durante 40 días con objeto de obtener una germinación más precoz y homogénea
- debido a la complejidad de la sembradora automática y a la gran cantidad de elementos mecánicos en contacto con el sustrato, la siembra se llevó a cabo manualmente con las máximas condiciones de esterilidad con el fin de evitar posibles contaminaciones
- el abonado de fondo del sustrato se redujo a la mitad, respecto a la dosis normal empleada en el vivero, con objeto de facilitar la micorrización (Molina, 1979), aplicándose 0,28 g de superfosfato de cal, 0,32 g de Osmocote Start (12-11-17 + 2 MgO + Te) y 0,28 g de Ficote (15-8-12 + 2 MgO + Te) por cada litro de sustrato. A una temperatura de 21 ºC el Osmocote Start tiene un periodo de liberación de 6 semanas y el Ficote de 3 ó 4 meses

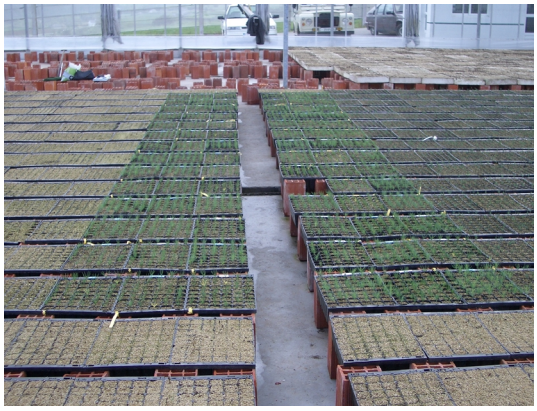


Foto 11.- Parcela de ensayo en el interior del invernadero

- no se aplicó ningún tipo de tratamiento fitosanitario preventivo con el fin de evitar posibles interacciones con el proceso de micorrización

El resto del proceso del cultivo fue exactamente igual al empleado normalmente en el vivero:

- el sustrato se elaboró en una mezcladora de sustratos utilizando 26 % de turba negra, 55 % de turba rubia, 15 % de corteza de pino triturada y compostada, 2 % de perlita y

2 % de poliespán triturado, con adición de 0,03 litros de agua al 0,1 % de Beltanol (Quinosol 50 %) y 0,04 litros de agua al 0,15 % de hipoclorito sódico por cada litro de sustrato, además del abonado de fondo. Finalmente dio un pH de 4,58

- los envases utilizados consistieron en bandejas reutilizables rígidas de polietileno de 48 alveolos de 150 cc de capacidad, de Arnabat, previamente desinfectadas con hipoclorito sódico al 10 %

- se sembraron dos semillas por alveolo a una profundidad de 1 cm aproximadamente cubriéndolas posteriormente con vermiculita (grado 2) y aplicando un abundante riego de humectación

Foto 12.- Ensayo listo para ser trasladado al exterior

- una vez realizada la siembra, las bandejas se introdujeron en una cámara de cultivo oscura, a 25 ºC de temperatura y 98 % de humedad relativa, durante un periodo de 15 días, hasta que se produjo la germinación del 10 % de las semillas aproximadamente, momento en el que se trasladaron a un invernadero de cristal con regulación del sombreo y de la apertura cenital automatizados

- tras un periodo de crecimiento de 68 días en el interior del invernadero, cuando las plantas habían alcanzado una altura media cercana a los 10 cm, las bandejas se trasladaron a su emplazamiento definitivo en el exterior para la fase de endurecimiento

- a lo largo de todo el proceso se aplicó una pequeña dosis de fertirrigación diaria consistente en 0,006 mg de Peters Plant Starter (10-52-10) por planta

Foto 13.- Parcela de ensayo en el exterior

- el sustrato no se esterilizó con el fin de mantener en todo momento unas condiciones de producción lo más semejantes posible al proceso productivo

normal del vivero. Respecto a este punto, cabe señalar que se han realizado ensayos que demuestran la existencia de bacterias beneficiosas para el proceso de la micorrización en coníferas (Garbaye y Bowen, 1989; Duponnois y Garbaye, 1991a,b) y que la desinfección del suelo o la aplicación de pesticidas puede desequilibrar las comunidades microbianas del suelo influyendo decisivamente en la formación de ectomicorrizas (Trappe *et al.*, 1984; De Oliveira y Garbaye, 1989; Garbaye, 1991). En otros estudios, en los que se inocularon plántulas de *Quercus robur* en contenedor con inóculo miceliar de *Laccaria laccata* (Garbaye *et al.*, 1991), la esterilización del sustrato provocó una reducción significativa en la formación de ectomicorrizas respecto al sustrato no esterilizado, lo que sugiere la presencia en la turba de comunidades microbianas que favorecen la micorrización (Garbaye y Bowen, 1987) o la liberación de sustancias inhibidoras como consecuencia del tratamiento de calor (Rovira y Bowen, 1966). Founoune *et al.* (2002) demostraron que ciertas bacterias presentes en el suelo, a las que denominan "Mycorrhiza Helper Bacteria", en concreto del género *Pseudomonas*, pueden estimular la simbiosis micorrícica en condiciones tropicales.

3.3.9. Inoculación

La dosis de inoculación se determinó en base a los ensayos de inoculación de *Pinus pinaster* realizados por Pera (Pera, 1993), en los que evaluó las dosis más convenientes de inóculo esporal e inóculo miceliar en sustrato de turba-vermiculita y en alginato polimerizado de varios hongos ectomicorrícicos. Finalmente se optó por una dosis 1:16 de inóculo de *Paxillus involutus* / sustrato dado que fue una de las dosis que mejor resultados ofreció en la generalidad de todos los hongos ectomicorrícicos ensayados en el trabajo mencionado, a pesar de que esta cepa y especie en concreto no había sido ensayada. El sustrato definitivo, inoculado con *Paxillus involutus*, se elaboró mezclando 8 litros de medio de cultivo MMN turba-vermiculita, perfectamente colonizado por el hongo, con 128 litros del sustrato elaborado en Viveros Forestales Mañente.

La dosis de inóculo de *Pisolithus tinctorius*, se estableció, al igual que en el caso anterior, a partir de los resultados obtenidos por Pera (Pera, 1993), escogiendo una dosis de 1.000.000 de basidiosporas por planta (5.714 basidiosporas/cm^3) por ser una de las dosis que mejor resultados había ofrecido. El inóculo base se preparó mezclando 4 g de esporas con 1.000 cm^3 de vermiculita grado 3 previamente humedecido al 20 % con agua. Como la dosis esporal elegida fue de 5.714 basisiosporas/cm^3, se hizo una dilución de 80 cm^3 de inóculo base en 7,9 litros de vermiculita (grado 3), que se mezcló con 128 litros de sustrato, obteniendo así el

sustrato definitivo, inoculado con *Pisolithus tinctorius*, con una dosis esporal de 5.714 basidiosporas/cm^3.

Para obtener el tercer tipo de sustrato, el sustrato control, se mezcló la misma cantidad de vermiculita pura (grado 3) que en los dos casos anteriores.

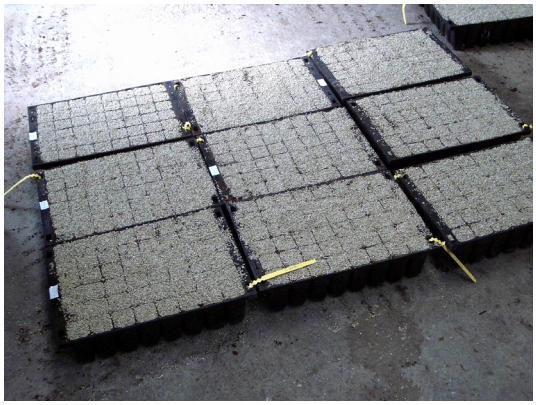


Foto 14.- Bandejas sembradas y eiquetadas, listas para ser llevadas a la cámara de cultivo

El 18 de marzo de 2004, se realizó manualmente la mezcla del sustrato con cada uno de los inóculos, a la dosis descrita, en contenedores de 100 litros previamente desinfectados con hipoclorito sódico al 20 % y evitando en todo momento cualquier foco de contaminación. Inmediatamente después, una vez elaborados los tres tipos de sutrato (sustrato inoculado con *Paxillus involutus*, sustrato inoculado con *Pisolithus tinctorius* y el sustrato control) se procedió al llenado y codificación de las bandejas que ya estarían listas para la siembra.

3.3.10. Control del ensayo

Durante los tres primeros meses se llevó a cabo un seguimiento semanal del ensayo en el que se contaba el número de semillas germinadas por tratamiento y se eliminaban las plántulas enfermas así como las necesarias para dejar una única plántula por alveolo. Además, durante toda la duración del ensayo, cada dos semanas, se medía la longitud de 12 plantas por bandeja, desde la superficie del sustrato hasta el extremo del meristemo apical, y se recogieron todas aquellas plantas enfermas para proceder a su posterior análisis en el laboratorio.

El 26 de agosto se extrajeron 10 plántulas completas por bandeja, 20 por tratamiento. En el momento del muestreo se cortaba la parte aérea al nivel del suelo y se tomaban datos del peso verde y de su altura y se introducían en sobres etiquetados. Los cepellones perfectamente humectados se lavaban bajo un suave chorro de agua corriente sobre un tamiz de 5 mm, se introducían en botes perfectamente etiquetados y se llenaban con una mezcla al 75 % de etanol y 25 % de agua para su perfecta conservación. Las partes aéreas tras desecarlas en una estufa a 70 ºC durante 48 horas, momento en el que ya habían alcanzado el peso seco constante, se pesaban en una balanza de precisión de hasta 10 centésimas de gramo.

3.3.11. Análisis de laboratorio

Una vez en el laboratorio se analizó la totalidad del sistema radicular de cada una de las plantas exactamente igual que en el experimento realizado en suelo (Epígrafe. 3.2.11. "Análisis de laboratorio").

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro*

4.1.1. Morfología y crecimiento de las colonias

Todas las descripciones se hicieron a los 15, 30 y 45 días. Los colores se identificaron mediante la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS Colour Chart) (foto 31). En la página 129 se muestra una tabla resumen de las descripciones aquí desarrolladas (tabla 18).

4.1.1.1. *Boletus badius* (Sarria)

4.1.1.1.1. *Boletus badius* (Sarria) en MMN

Las colonias obtenidas en MMN son las que tuvieron una velocidad de crecimiento más elevada y las que alcanzaron los mayores tamaños (40,9 mm de radio medio) (tabla 8). A pesar de ello, algunas repeticiones no mostraron actividad: a pH 5.0 se formaron cuatro colonias, a pH 5.5 las seis y a pH 6.0 cinco.

A los 15 días no se observan diferencias morfológicas atribuibles al pH. Las colonias son de textura algodonosa, muy densas, perfectamente circulares, márgenes difusos y con gran cantidad de micelio aéreo que confiere a las colonias una forma abovedada de color blanco puro. Por el reverso son de color blanco marfil, más claro en el margen (156 C) y oscuro hacia el centro (159 C).

A los 30 días las colonias han alcanzado un tamaño considerable (20-25 mm de radio). Poseen abundante micelio aéreo, blanco y algodonoso, que alcanza la tapa superior de la placa. En los márgenes se observan las hifas en crecimiento radial e inclinadas en el sentido de las agujas del reloj. Estos márgenes tienen aspecto algodonoso, son laxos a pH 5.0 y más densos a pH 5.5 y 5.6. Por el reverso las colonias son de color blanco amarillento en el centro (158 A), volviéndose blanco anaranjado hacia el borde (159 D). Las zonas más envejecidas se tornan de tonalidades amarillentas (14 D – 163 A – 164 B).

A los 45 días todas las colonias son de gran tamaño (23-33 mm de radio medio), sin observarse diferencias significativas entre los tres pH (fig. 16). Estas colonias son perfectamente circulares, de color amarillo pálido (hacia 11 D) al reverso, volviéndose más claro hacia los bordes. El micelio al envejecer se vuelve de color gris amarillento (161 C) (foto 15). Poseen exudados diminutos y distribuídos concéntrica o irregularmente, más numerosos a pH 5.0 que a 5.5 y 6.0.

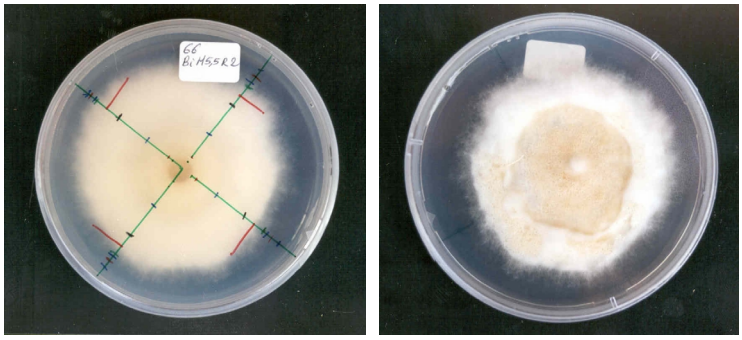


Foto 15. *Boletus badius*, Sarria, en MMN a pH = 5.5, a los 60 días. Reverso (izq) y anverso (dcha).

4.1.1.1.2. *Boletus badius* (Sarria) en Raper

El crecimiento de las colonias en medio de cultivo Raper ha sido nulo (fig. 16).

El único pH en el que se mostró algún cambio fue a pH 6.5, en el que a los 15 días se observaba el disco de siembra cubierto por una muy baja densidad de hifas apenas perceptibles a simple vista. En adelante no mostró cambios. A pH 7.0 y 7.5 no se observó ningún tipo de actividad (foto 16).

4.1.1.1.3. *Boletus badius* (Sarria) en agar-malta 4%

Las colonias alcanzaron tamaños medios (entre 13,0 y 27,7 mm de radio), siendo significativamente mayores a pH 4.5 (fig. 18).

A los 15 días, el disco de siembra se encuentra cubierto por hifas blanquecinas, más densas que las desarrolladas en PDA, que le confiere un aspecto aterciopelado. Comienzan a observarse hifas en desarrollo en el medio de cultivo. A los 30 días el disco ya se encuentra totalmente cubierto de un fieltro blanco que lo cubre totalmente pero continua sin apenas invadir el medio de cultivo.

A los 45 días las colonias de pH 4.5 ya se han desmarcado de las de pH 5.0 y 5.5, siendo de mayor extensión y ofreciendo dos morfologías diferentes (foto 17):

- La primera morfología (1) es de colonias circulares. El micelio es blanco algodonoso, denso, con micelio aéreo también muy denso y muy desarrollado en volumen alcanzando la tapa superior de la placa. Por el anverso se observan zonas envejecidas en el centro y en zonas concéntricas adoptando una coloración gris amarillenta (161 C más oscuro). Estas zonas envejecidas segregan exudados muy finos y brillantes de color ámbar. Por el reverso las placas presentan tres tonalidades diferentes que cambian gradualmente de forma concéntrica: hacia el

Con formato: Derecha

centro marrón (177 A), que se vuelve gradualmente a gris anaranjado (163 A) y más claro en los márgenes (13 D).

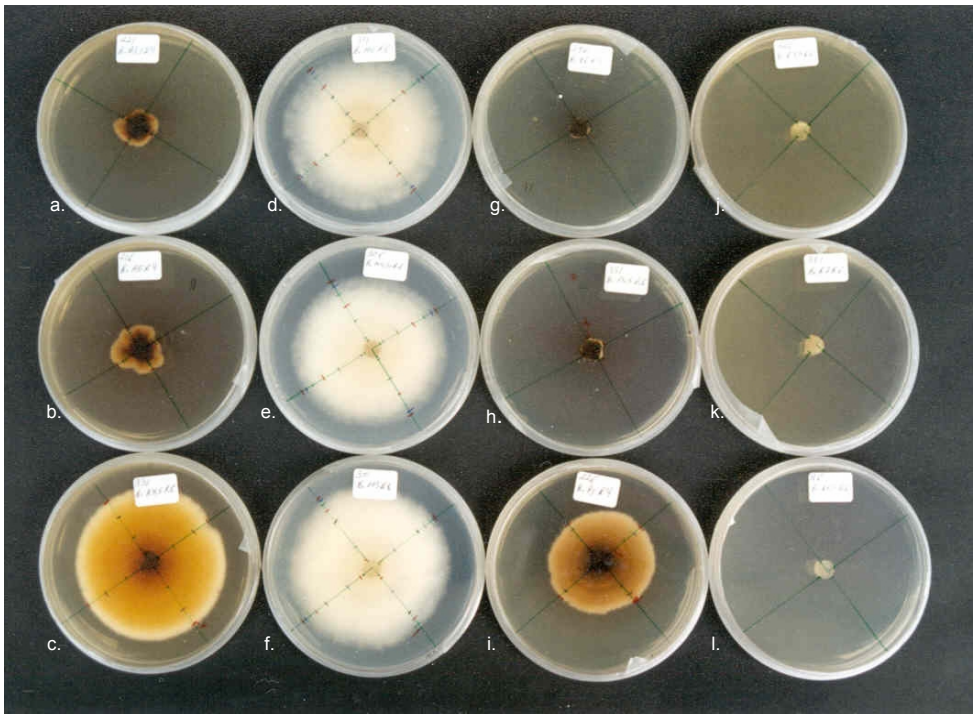


Foto 16. *Boletus badius*, Sarria, a los 45 días. a.- agar-malta, pH = 5,5; b.- agar-malta, pH = 5,0; c.- agar-malta, pH = 4,5; d.- MMN, pH = 6,0; e.- MMN, pH = 5,5; f.- MMN, pH = 5,0; g.- PDA, pH = 6,0; H.- PDA, pH = 5,5; i.- PDA, pH = 5,0; j.- Raper, pH = 7,5; k.- Raper, pH = 7,0; l.- Raper, pH = 6,5

- La segunda morfología (2) se desarrolla mucho menos y es similar que a pH 5.0 y 5.5. Las colonias son muy irregulares. Por el anverso, el micelio es muy compacto con aspecto de fieltro que cubre totalmente el inóculo, bordes blanquecinos y muy pegados al medio. No tiene micelio aéreo. Al envejecer se vuelve, al igual que la morfología (1), gris amarillento. Por el reverso se observan tonalidades desde marrón en el centro (165 A más claro) a crema hacia el borde (164 B).

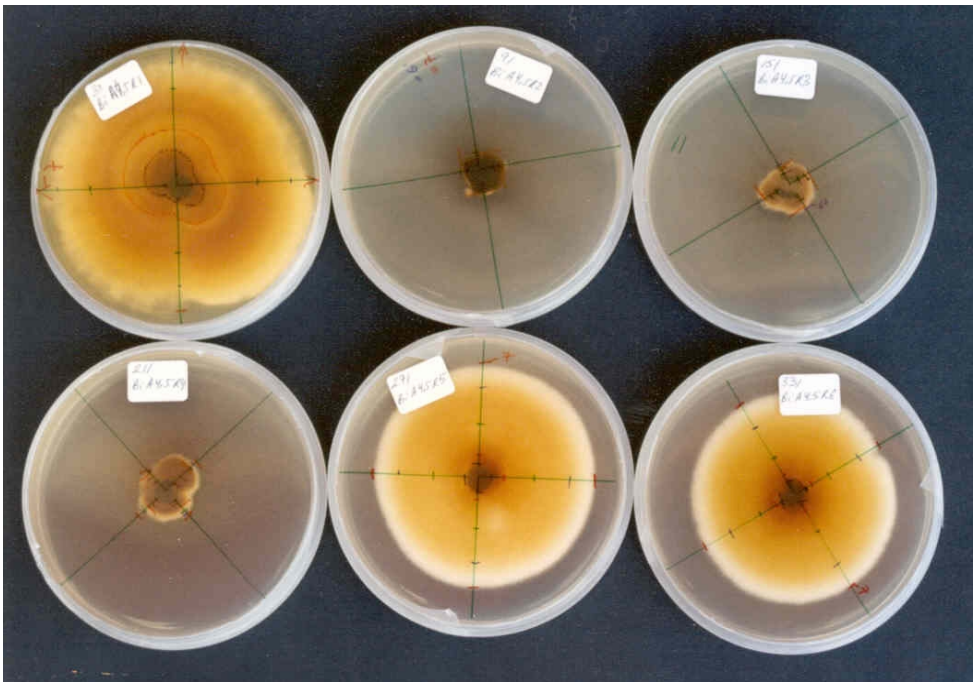


Foto 17. *Boletus badius*, Sarria, en Agar-malta, a pH = 4.5, a los 45 días. Las 6 repeticiones del tratamiento

4.1.1.1.4. *Boletus badius* (Sarria) en PDA

La morfología de las colonias es similar en los tres pH, pero difieren en la velocidad de crecimiento y en el tamaño final de las colonias, siendo a pH 5.0 donde se obtienen los mejores resultados (29,5 mm de radio medio) (fig. 19).

A los 15 días el disco de siembra ya se encuentra cubierto por hifas blanquecinas que le confieren un aspecto aterciopelado, más denso a pH 6.0 que a pH 5.0 y 5.5. El micelio comienza a desarrollarse en el medio de cultivo aunque muy escasamente.

A los 30 días se observa cierta heterogeneidad en el crecimiento de las colonias, detectando algunas sin apenas crecimiento y otras bien desarrolladas (pH 5.0). Las colonias de mayor tamaño (pH 5.0) son de forma regular aunque algo excéntricas. Se observan en el margen las hifas en crecimiento dispuestas ordenadamente, de forma radial y de aspecto algodonoso. La colonia se desarrolla pegada al medio del cultivo, de forma compacta, con márgenes precisos, sin micelio aéreo y de color blanco, tornándose de color amarillo grisáceo aquellas zonas más envejecidas. No tiñe el medio. Las colonias continúan creciendo manteniendo la misma morfología aunque se van extendiendo de forma irregular zonas

amarillo grisáceas debido a la senectud del micelio. Por el reverso, se observa un gradiente de color desde el centro hasta el margen: marrón oscuro en la zona del inóculo (200 A) que se va aclarando paulatinamente tomando una coloración gris amarillenta (161 A) hasta alcanzar tonalidades cremosas en el margen (161 C).

Las colonias que han crecido a pH 5.5 y 6.0 se han mantenido prácticamente latentes hasta los 50 días en que han comenzado a desarrollarse con mayor ritmo pero sin alcanzar en ningún caso los tamaños de colonia de pH 5.0 (fig. 19), aunque la morfología es similar.

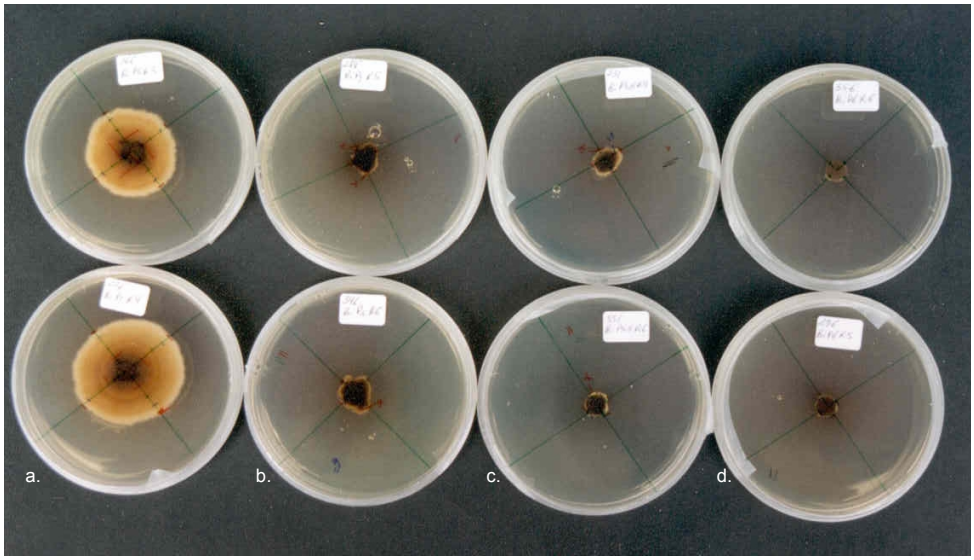


Foto 18. *Boletus badius*, Sarria, en PDA, a los 45 días. Columnas a. y b.: pH = 5; columna c.: pH = 5.5; columna d.: pH = 6.0.

4.1.1.1.5. Crecimiento de *Boletus badius* (Sarria)

El medio de cultivo con el que se obtuvieron mejores resultados fue MMN llegando, incluso, algunas colonias, a ocupar la placa Petri por completo (40,9 mm de radio medio) a los 50 días, aunque no se encontraron diferencias significativas entre pH (fig. 16). Los resultados más bajos se obtuvieron con medio Raper, donde algunas colonias prácticamente no crecieron, o en el caso de pH 7.5 no se llegaron a desarrollar. (fig. 17). PDA y AM dieron crecimientos intermedios y muy similares. El mejor pH para AM fue el de 4.5 (27,7 mm de radio medio) siendo significativamente superior a 5.0 y 5.5 (16,4 y 13,0 mm de radio medio respectivamente) (fig. 18). En PDA los mejores crecimientos fueron a pH 5.0 (29,5 mm de

Tabla 13.- Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (Sarria) para los diferentes medios de cultivo

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	***Boletus badius* (Sarria) RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
MMN 5.0	4,350 ab	7,833 a	15,700 a	19,417 a	21,883 a	23,683 a	24,567 a	26,400 a	27,600 a	28,217 a	28,219 a	28,688 a
MMN 5.5	4,967 a	11,000 a	21,767 a	26,617 a	30,517 a	32,850 a	34,750 a	36,567 a	40,117 a	40,617 a	40,715 a	40,896 a
MMN 6.0	4,017 b	7,567 a	15,533 a	21,650 a	26,033 a	28,683 a	30,467 a	31,867 a	33,517 a	34,133 a	34,150 a	34,150 a
DMS	0,713	3,914	8,619	10,950	12,770	13,990	14,780	15,810	16,630	17,000	17,250	17,695
RAPER 6.5	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,083 a	4,333 a	5,004 a	5,146 a
RAPER 7.0	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 b	4,108 b
RAPER 7.5	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 b	4,000 b
MDS	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,145	0,370	0,456	0,562
AM 4.5	4,000 a	4,183 b	5,783 a	8,117 a	12,900 a	18,300 a	22,083 a	24,683 a	26,100 a	26,717 a	27,735 a	27,750 a
AM 5.0	4,000 a	4,500 a	5,183 a	5,517 b	6,433 b	7,150 b	8,400 b	9,400 b	12,233 b	13,983 b	15,042 b	16,392 ab
AM 5.5	4,000 a	4,267 b	4,533 b	4,883 b	5,633 b	6,283 b	7,217 b	8,433 b	10,583 b	11,617 b	12,738 b	13,046 b
DMS	0,000	0,281	1,128	2,463	5,139	8,391	10,850	12,280	12,540	12,390	12,256	12,065
PDA 5.0	4,017 a	4,133 a	5,017 a	6,217 a	9,000 a	12,133 a	14,967 a	17,550 a	24,900 a	27,800 a	28,783 a	29,504 a
PDA 5.5	4,000 a	4,083 a	4,233 b	4,300 b	4,367 b	4,650 b	5,217 b	6,383 b	8,900 b	11,167 b	13,788 b	15,704 b
PDA 6.0	4,000 a	4,000 a	4,000 b	4,000 b	4,067 b	4,267 b	4,517 b	4,933 b	6,600 b	7,850 b	9,671 b	10,417 b
DMS	0,029	0,221	0,463	1,227	2,839	4,512	4,492	6,529	10,440	11,830	12,526	12,968
MMN	4,446 a	8,786 a	17,656 a	22,556 a	26,142 a	28,390 a	29,925 a	31,599 a	33,733 a	33,798 a	34,315 a	34,315 a
RAPER	4,000 b	4,000 b	4,000 b	4,000 b	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,025 c	4,035 c	4,111 c	4,335 c
AM	4,000 b	4,301 b	5,157 b	6,174 b	8,310 b	10,564 b	12,547 b	14,167 b	16,290 b	16,415 b	17,414 b	18,478 b
PDA	4,004 b	4,071 b	4,417 b	4,833 b	5,808 bc	7,006 bc	8,229 bc	9,604 bc	13,450 b	13,689 b	15,599 b	17,414 b
DMS	0,226	1,133	2,433	3,101	4,003	5,016	5,800	6,389	7,174	7,391	7,856	8,026

Tabla 14.- Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (Sarria)

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	***Boletus badius* (Sarria) RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
AM 4.5	4,000 b	4,183 c	5,783 c	8,117 c	12,900 c	18,300 cd	22,083 bc	24,683 bc	26,100 b	26,717 b	27,735 b	27,750 bc
AM 5.0	4,000 b	4,500 c	5,183 c	5,517 c	6,433 cd	7,150 e	8,400 de	9,400 de	12,233 c	13,983 c	15,042 c	16,392 d
AM 5.5	4,000 b	4,267 c	4,533 c	4,883 c	5,633 d	6,283 e	7,217 de	8,433 de	10,583 c	11,617 c	12,738 c	13,046 d
MMN 5.0	4,350 b	7,833 b	15,700 b	19,417 b	21,883 b	23,683 bc	24,567 b	26,400 abc	27,600 b	28,217 b	28,219 b	28,688 ab
MMN 5.5	4,967 a	11,000 a	21,767 a	26,617 a	30,517 a	32,850 a	34,750 a	36,567 a	40,117 a	40,617 a	40,715 a	40,896 a
MMN 6.0	4,017 b	7,567 b	15,533 b	21,650 ab	26,033 ab	28,683 ab	30,467 ab	31,867 ab	33,517 ab	34,133 ab	34,150 ab	34,150 ab
PDA 5.0	4,017 b	4,133 c	5,017 c	6,217 c	9,000 cd	12,133 de	14,967 cd	17,550 cd	24,900 b	27,800 b	28,783 b	29,504 ab
PDA 5.5	4,000 b	4,083 c	4,233 c	4,300 c	4,367 d	4,650 e	5,217 de	6,383 e	8,900 c	11,167 c	13,788 c	15,704 cd
PDA 6.0	4,000 b	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,067 d	4,267 e	4,517 e	4,933 e	6,600 c	7,850 c	9,671 c	10,417 d
RAPER 6.5	4,000 b	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 d	4,000 e	4,000 e	4,000 e	4,083 c	4,333 c	5,004 c	5,146 d
RAPER 7.0	4,000 b	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 d	4,000 e	4,000 e	4,000 e	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,108 d
RAPER 7.5	4,000 b	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 d	4,000 e	4,000 e	4,000 e	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 d
DMS	0,335	1,844	4,085	5,297	6,595	7,944	8,980	9,880	10,930	11,330	11,658	11,956

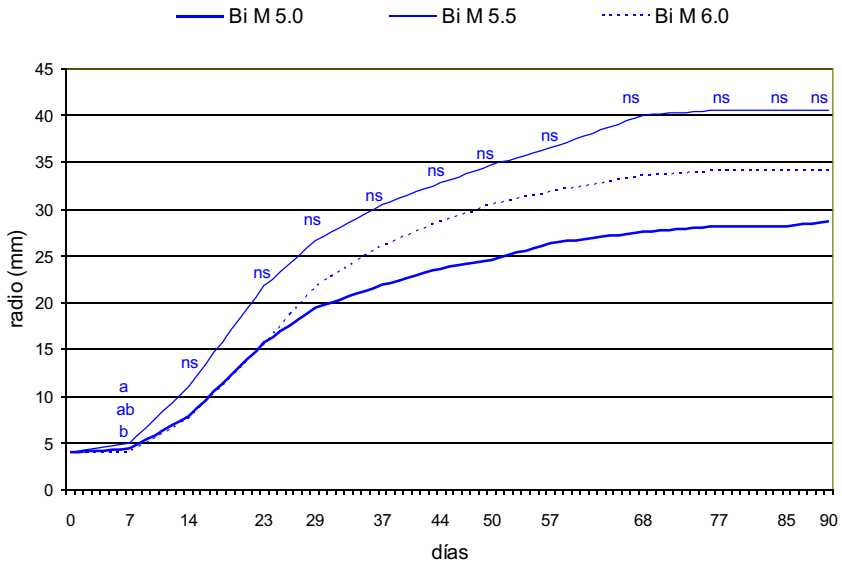


Fig. 16.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo MMN.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna ;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "M+nº"- medio de cultivo MMN y pH.

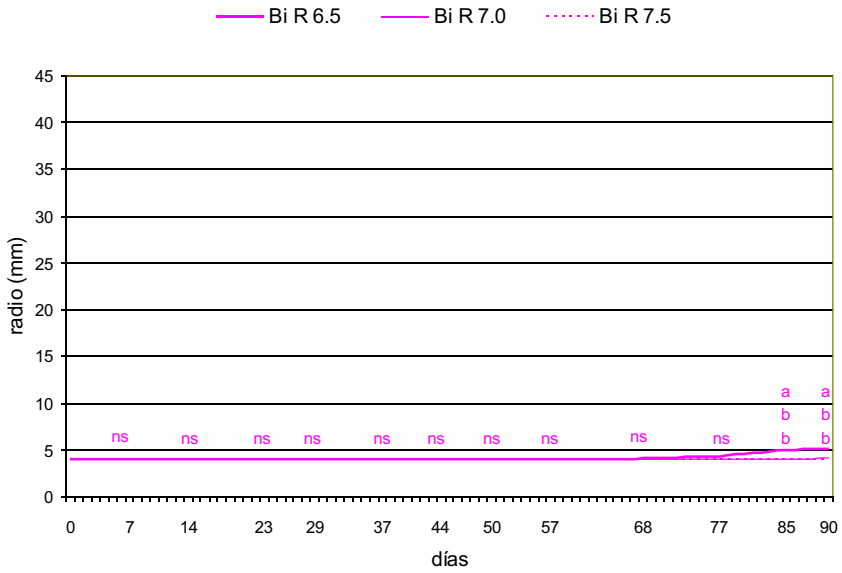


Fig 17.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo Raper.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "R+nº"- medio de cultivo Raper y pH.

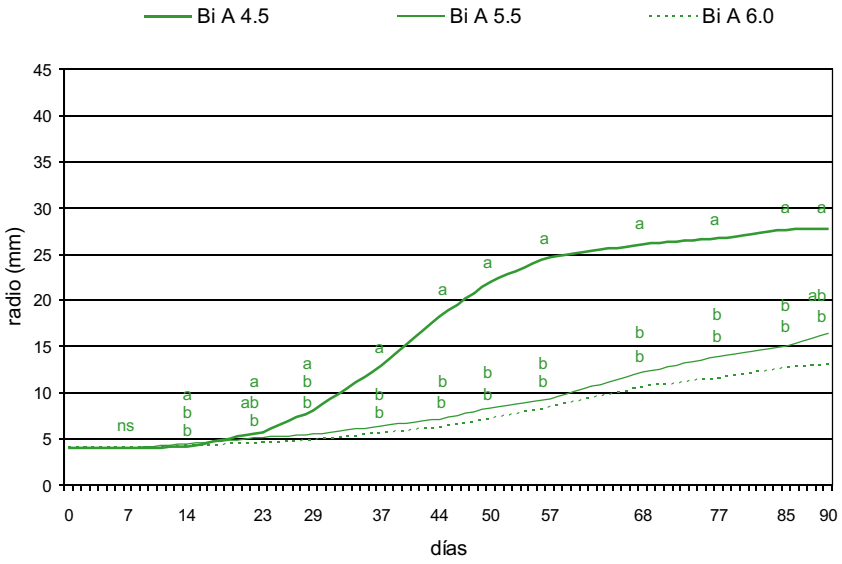


Fig. 18.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo Agar-malta 4%.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "A+nº"- medio de cultivo Agar-malta 4% y pH.

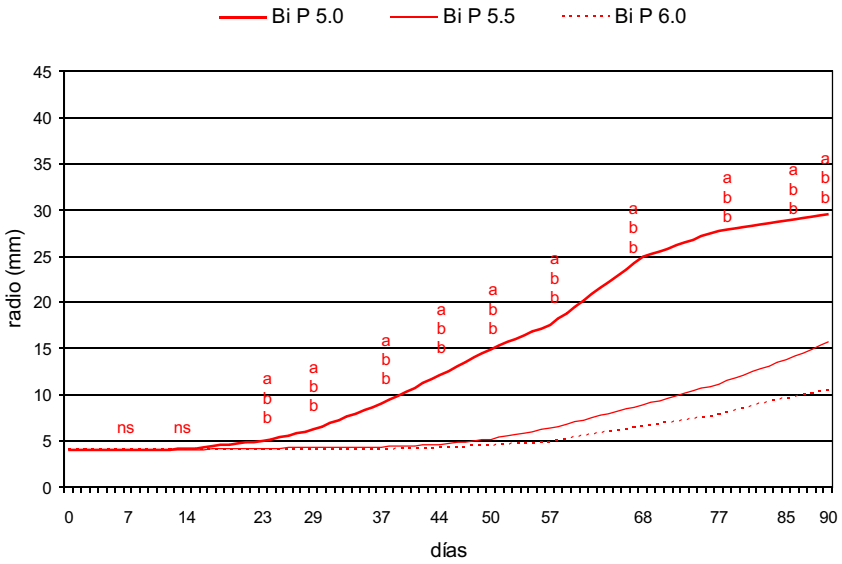


Fig. 19.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria) en medio de cultivo PDA.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "P+nº"- medio de cultivo PDA y pH.

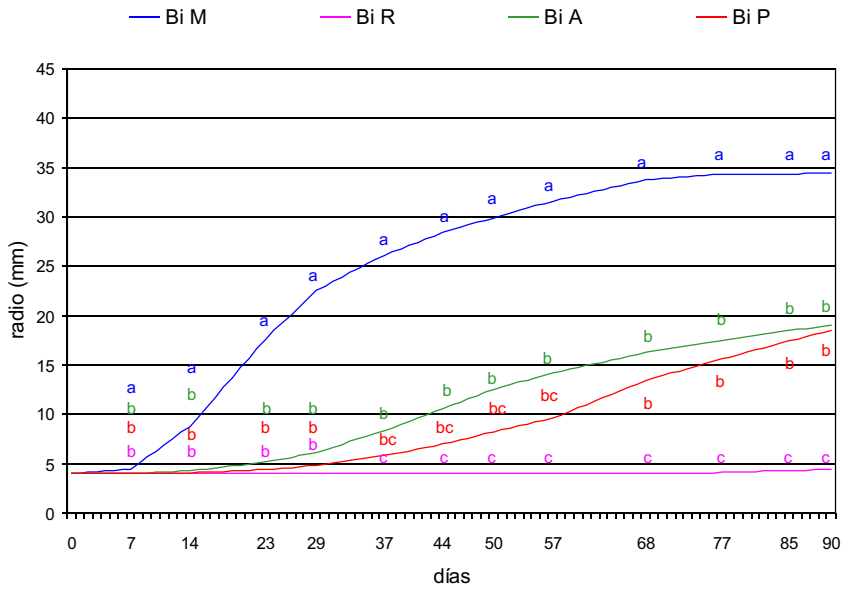


Fig. 20.- Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Boletus badius* (Sarria).
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "M"- MMN; "R"- Raper; "A"- Agar-malta 4%; "P"- PDA.

radio medio), seguido de 5.5 y 6.0 (15,7 y 10,4 mm de radio medio respectivamente) (fig. 19). Se observa que los medios de cultivo más ácidos favorecen el crecimiento tanto en PDA como en AM.

4.1.1.2. *Boletus badius* (San Vicente do Mar)

4.1.1.2.1. *Boletus badius* (San Vicente) en MMN

La morfología es similar en los tres pH (foto 19). A los 15 días la colonia es perfectamente circular, de textura algodonosa, muy densa, margen algo difuso debido a la menor densidad de hifas. Por el anverso, micelio aéreo de color blanco, bien desarrollado, deprimido en el centro. Por el reverso, de color blanco marfil más claro en el margen (158 D) y oscuro hacia el centro (158 A) formando círculos concéntricos.

A los 30 días la apariencia es similar aunque el micelio aéreo se ha extendido más, alcanzando en algunos casos la tapa superior de la placa. Presenta al reverso cambios de

tonalidad concéntricas, siempre blanco marfil, en el centro color 158 A – 162 D que se vuelve más claro hacia el margen.

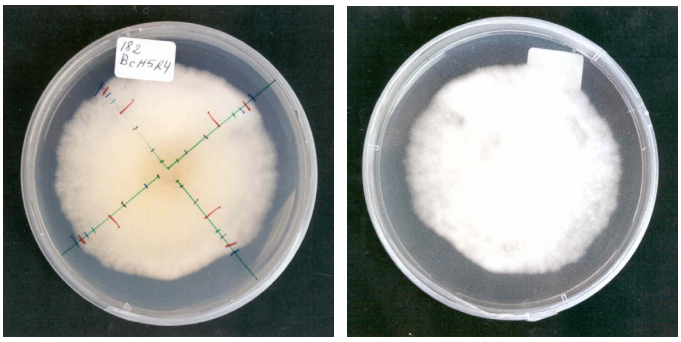


Foto 19. *Boletus badius*, San Vicente, en MMN, a pH = 5.0, a los 60 días. Reverso y anverso.

4.1.1.2.2. *Boletus badius* (San Vicente) en Raper

A los 15 días el crecimiento es escaso. El disco de siembra está cubierto por un micelio algodonoso muy denso, más laxo a pH 7.0 y sin desarrollo perceptible a pH 7.5 (fig. 22).

A los 30 días, las colonias de pH 6.5 tienen un escaso crecimiento y apenas invaden el agar, son de forma irregular por desarrollarse a partir de escasos puntos activos del disco de siembra. Presentan micelio aéreo, blanco y algodonoso, y los márgenes son precisos. Por el reverso son de color gris amarillento (162 C) (foto 20). Las colonias de pH 7.0, en cambio, presentan menos crecimiento, mostrando el disco de siembra completamente cubierto por un micelio blanco, aterciopelado, muy denso, sin apenas desarrollo en el agar, con márgenes muy precisos y de color, al reverso, gris amarillento (162 C), al igual que las de pH 6.5. A pH 7.5 el crecimiento es prácticamente nulo, aunque se han iniciado algunas colonias de color blanco a partir de puntos activos del inóculo, pero en ningún caso invaden el medio de cultivo.

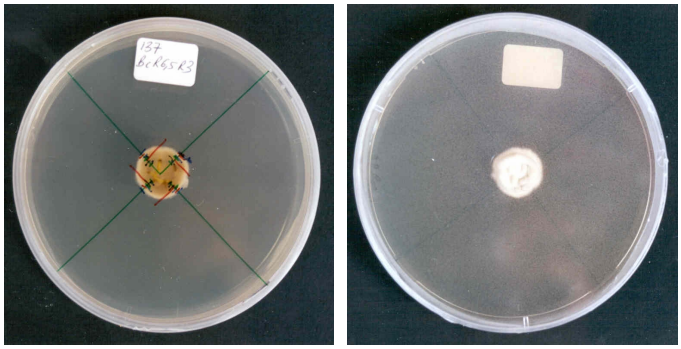


Foto 20. *Boletus badius*, San Vicente, en Raper, a pH = 6.5, a los 60 días. Reverso y anverso.

4.1.1.2.3. *Boletus badius* (San Vicente) en agar-malta 4%

A los 15 días las colonias son muy irregulares, de color blanco, algodonosas y muy densas excepto a pH 5.5 que son más laxas y de escaso crecimiento. Sólo las colonias que crecen a pH 5.0 presentan micelio aéreo. A los 30 días continúan con una forma muy irregular debido a su desarrollo a partir de algunos puntos activos del inóculo. Por el reverso tienen un color amarillo verdoso grisáceo (160 D) hacia el centro y márgenes blanquecinos. A pH 5.0 y 5.5 el micelio aéreo se ha desarrollado considerablemente formando una colonia algodonosa y abovedada en el centro.

A los 45 días el micelio ha ido envejeciendo tomando en los márgenes una coloración gris amarillenta (161 A). Las colonias a pH 4.5 continúan sin micelio aéreo. Al reverso son de color gris amarillento claro (162 D más oscuro).

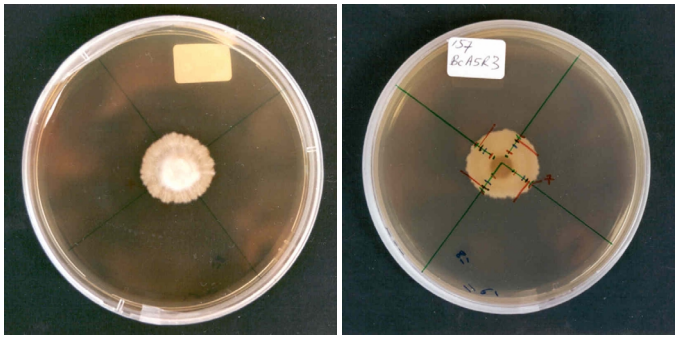


Foto 21. *Boletus badius*, San Vicente, en agar-malta, a pH = 5.0, a los 60 días.

4.1.1.2.4. *Boletus badius* (San Vicente) en PDA

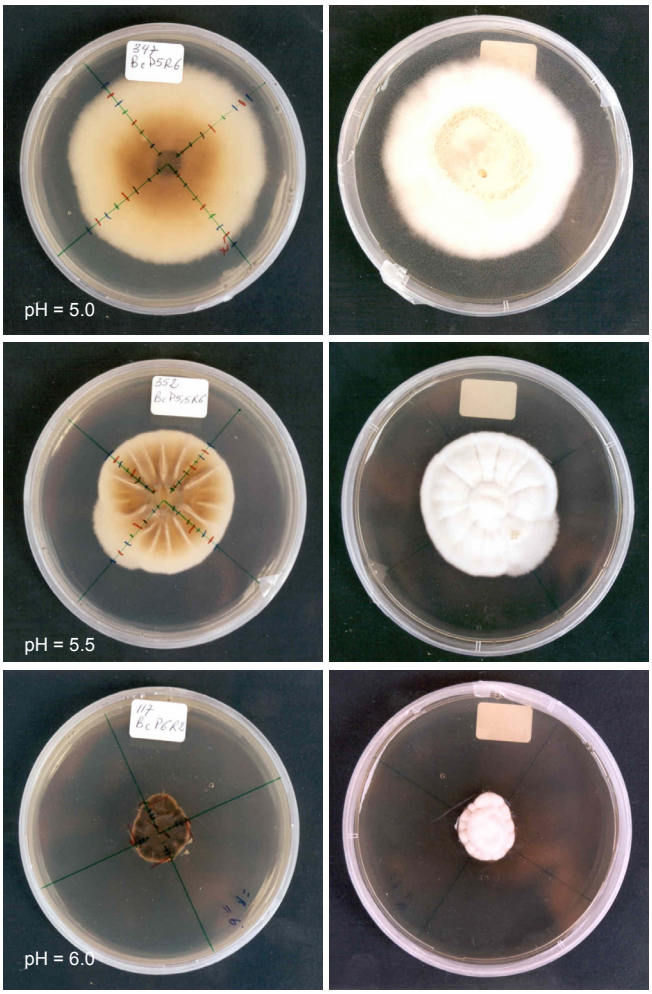


Foto 22. *Boletus badius*, San Vicente, en PDA, a pH = 5.0, 5.5 y 6.0, a los 60 días. Reverso y anverso.

A los 15 días las colonias son perfectamente circulares, de textura algodonosa, muy densas y de color blanco puro. A medida que las colonias van creciendo se vuelven más irregulares, compactas y de márgenes precisos. Por el reverso son de color blanco marfil.

A los 30 días se detectan en algunas colonias hendiduras radiales muy pronunciadas y diminutos exudados traslúcidos o de color ámbar (foto 22). Por el anverso, al envejecer se vuelve de color gris (156 C) o gris amarillento (161 C). Al reverso, el centro es de color pardo oscuro (165 A), volviéndose marrón grisáceo (199 A) y margen más claro, gris amarillento (161 D). A pH 5.0 y 5.5, pueden presentar o no, tanto hendiduras radiales como exudados. A pH 6.0 el crecimiento es mucho menor y presentan micelio blanco y compacto (foto 22).

4.1.1.2.5. Crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente)

A diferencia de la cepa de Sarria, en MMN las colonias no se desarrollaron bien, siendo el pH 5.5 el que tuvo peores resultados (8,9 mm de radio medio); en pH 5.0 y 6.0 se obtuvieron

colonias similares (fig. 21) aunque con un tamaño medio al final del ensayo (25,2 y 34,2 mm de radio medio respectivamente a los 90 días de cultivo). Cuando se utilizó Raper, las colonias fueron en general muy pequeñas, de hasta 11 mm de radio (fig. 22). Las colonias mayores se obtuvieron en PDA (33,3 mm de radio medio) aunque sin alcanzar, en ningún caso, a ocupar la placa Petri por completo; los mejores pH resultaron 5.0 y 5.5 (33,3 mm de radio medio) que fueron significativamente mejores que pH 6,0 (20,9 mm de radio medio) (fig. 24). En AM las colonias fueron muy pequeñas, similares al cabo de 90 días a las desarrolladas en Raper, aunque tuvieron un crecimiento inicial muy fuerte, estancándose al cabo de un mes aproximadamente (fig. 23).

4.1.1.3. *Paxillus involutus*

4.1.1.3.1. *Paxillus involutus* en MMN

La morfología fue similar en los tres pH (foto 24). A los 15 días las colonias son, por el anverso, algodonoso-lanosas salpicadas por un micelio aéreo formado por puntos dispersos más densos que les confieren un aspecto pulverulento. La forma de las colonias es irregular y los bordes difusos. El color por el reverso es pardo oscuro en el centro (200 A) aclarándose y tomando una coloración cremosa hacia el exterior (165 A – 165 B) y más claro en el margen (161 A). A pH 6.0 presentan estos mismos colores pero con tonalidades más oscuras. El medio se tiñe de anaranjado grisáceo (175 A).

4.1.1.3.2. *Paxillus involutus* en Raper

A los 15 días el crecimiento es desigual. Se forman colonias diminutas, de color grisáceo, a partir de puntos activos en la periferia del punto de siembra. Por el anverso el micelio es gris verdoso (197 D) y en algún caso amarillento (4 D). No produce exudados, excepto a pH 7.0, y alguna placa presenta arrugas radiales aunque poco numerosas. Por el reverso es de color marrón oscuro (200 A). Tiñe el medio de color marrón claro (164 B) que, más adelante, a los 30 días, se transforma en una aureola aceitosa alrededor de la colonia.

A los 45 días los márgenes se vuelven más difusos. Por el anverso el micelio presenta muy diferentes coloraciones distribuídas normalmente de forma concéntrica: márgenes de color crema (198 D) y zonas intermedias amarillas (2 D) también presentes a veces en el margen. Tiene micelio aéreo poco denso y aspecto pulverulento de distintas coloraciones. Por el reverso es de color verde oliva a marrón en el centro (199 A más oscuro) y zonado de negro. A veces presentan líneas concéntricas de diferentes tonalidades siempre entre amarillo verdoso y marrón-grisáceo-oliváceo. A pH 7.0 han aparecido más coloraciones diferentes por el anverso,

Tabla 15.- Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (San Vicente) para los diferentes medios de cultivo

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	***Boletus badius* (S. Vicente) RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
MMN 5.0	4,033 a	7,050 a	11,350 a	15,700 a	18,333 a	20,800 a	21,883 ab	23,017 ab	23,583 ab	24,250 ab	25,196 ab	25,196 ab
MMN 5.5	4,000 a	4,000 b	4,367 b	5,217 b	6,300 b	7,150 b	7,733 b	8,083 b	8,483 b	8,650 b	8,642 b	8,904 b
MMN 6.0	4,033 a	4,800 b	8,667 ab	12,733 ab	18,150 a	23,000 a	26,250 a	28,683 a	31,183 a	33,283 a	33,938 a	34,238 a
DMS	0,082	1,973	5,055	7,998	10,810	12,830	14,240	15,420	16,420	17,180	17,554	17,965
RAPER 6.5	4,000 a	4,550 a	5,183 a	5,533 a	5,917 a	6,367 a	7,017 a	7,683 a	8,917 a	9,717 a	10,792 a	10,883 a
RAPER 7.0	4,033 a	4,217 b	4,817 b	4,867 b	4,867 b	5,017 b	5,483 b	5,650 b	6,500 b	6,800 b	7,838 b	7,992 b
RAPER 7.5	4,000 a	4,000 b	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c	4,000 c
DMS	0,058	0,318	0,327	0,289	0,277	0,450	0,601	0,511	0,937	1,164	1,259	1,985
AM 4.5	5,017 a	7,950 a	10,717 a	11,433 a	12,017 a	12,350	12,433 a	12,783 a	13,017 a	13,533 a	13,758 a	13,813 a
AM 5.0	4,883 a	7,450 a	9,317 b	9,850 b	10,250 b	10,433	10,583 b	10,850 b	11,083 b	11,467 b	11,475 b	11,863 b
AM 5.5	4,067 b	4,883 b	5,600 c	6,067 c	6,600 c	6,883	7,233 c	7,933 c	8,417 c	8,933 c	9,525 c	9,696 c
DMS	0,437	0,702	1,381	1,387	1,423	1,315	1,356	1,222	1,031	1,251	1,369	1,968
PDA 5.0	4,817 a	7,667 a	11,650 a	14,750 a	18,267 a	21,733 a	24,700 a	27,933 a	32,317 a	33,200 a	33,267 a	33,267 a
PDA 5.5	4,950 a	8,033 b	11,817 a	14,033 a	16,600 a	19,067 a	21,633 a	24,750 a	30,517 a	32,967 a	33,179 a	33,263 a
PDA 6.0	4,583 a	6,100 a	8,067 b	9,833 b	11,267 b	12,300 b	13,417 b	14,533 b	16,667 b	17,233 b	18,600 b	19,513 b
DMS	0,820	1,156	1,294	1,653	2,550	3,440	4,238	4,832	6,380	7,436	8,126	9,025
MMN	4,018 b	5,279 b	8,121 b	11,196 ab	14,258 a	16,983 a	18,617 a	19,915 a	21,069 a	22,057 a	22,592 a	22,779 a
RAPER	4,013 b	4,239 c	4,664 c	4,797 c	4,933 c	5,132 c	5,494 b	5,774 b	6,463 b	6,826 b	7,543 b	7,625 b
AM	4,653 a	6,742 a	8,535 b	9,107 b	9,608 b	9,881 b	10,036 b	10,483 b	10,750 b	11,218 b	11,586 b	11,790 b
PDA	4,781 a	7,260 a	10,496 a	12,867 a	15,363 a	17,688 a	19,908 a	22,400 a	26,490 a	27,786 a	28,349 a	28,681 a
DMS	0,282	0,933	1,944	2,811	3,675	4,451	5,005	5,508	6,096	6,519	7,025	7,890

Tabla 16.- Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Boletus badius* (San Vicente)

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	***Boletus badius* (San Vicente) RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
AM 4.5	5,017 a	7,950 a	10,717 abc	11,433 ab	12,017 bc	12,350 b	12,433 b	12,783 bc	13,017 cd	13,533 cd	13,758 cd	13,813 cd
AM 5.0	4,883 a	7,450 a	9,317 abc	9,850 bc	10,250 cde	10,433 bc	10,583 bc	10,850 bcd	11,083 cd	11,467 cd	11,475 cd	11,863 cd
AM 5.5	4,067 b	4,883 c	5,600 de	6,067 cd	6,600 cdef	6,883 bc	7,233 bc	7,933 bcd	8,417 cd	8,933 cd	9,525 cd	9,696 cd
MMN 5.0	4,033 b	7,050 ab	11,350 ab	15,700 a	18,333 a	20,800 a	21,883 a	23,017 a	23,583 ab	24,250 ab	25,196 ab	25,196 ab
MMN 5.5	4,000 b	4,000 c	4,367 e	5,217 d	6,300 cdef	7,150 bc	7,733 bc	8,083 bcd	8,483 cd	8,650 cd	8,642 cd	8,904 cd
MMN 6.0	4,033 b	4,800 c	8,667 bc	12,733 ab	18,150 a	23,000 a	26,250 a	28,683 a	31,183 a	33,283 a	33,938 a	34,238 a
PDA 5.0	4,817 a	7,667 a	11,650 a	14,750 a	18,267 a	21,733 a	24,700 a	27,933 a	32,317 a	33,200 a	33,267 a	33,267 a
PDA 5.5	4,950 a	8,033 a	11,817 a	14,033 ab	16,600 ab	19,067 a	21,633 a	24,750 a	30,517 a	32,967 a	33,179 a	33,263 a
PDA 6.0	4,583 a	6,100 b	8,067 cd	9,833 bc	11,267 bcd	12,300 b	13,417 b	14,533 b	16,667 bc	17,233 bc	18,600 bc	19,513 bc
RAPER 6.5	4,000 b	4,550 c	5,183 e	5,533 d	5,917 def	6,367 bc	7,017 bc	7,683 bcd	8,917 cd	9,717 cd	10,792 cd	10,883 cd
RAPER 7.0	4,033 b	4,217 c	4,817 e	4,867 d	4,867 ef	5,017 c	5,483 bc	5,650 cd	6,500 d	6,800 d	7,838 d	7,992 d
RAPER 7.5	4,000 b	4,000 c	4,000 e	4,000 d	4,000 f	4,000 c	4,000 c	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,000 d
DMS	0,438	1,132	2,538	3,890	5,254	6,268	7,004	7,608	8,291	8,820	9,325	9,625

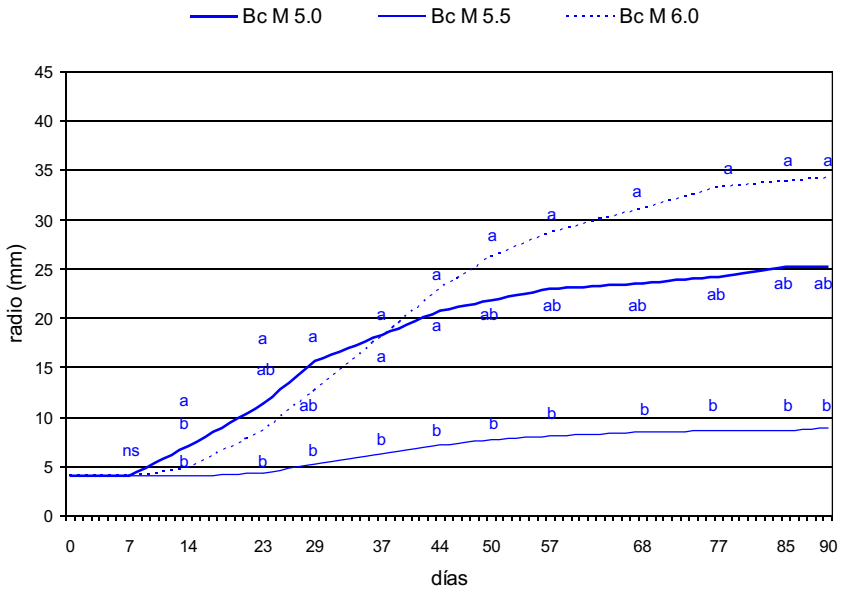


Fig. 21.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo MMN.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna ;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "M+nº"- medio de cultivo MMN y pH.

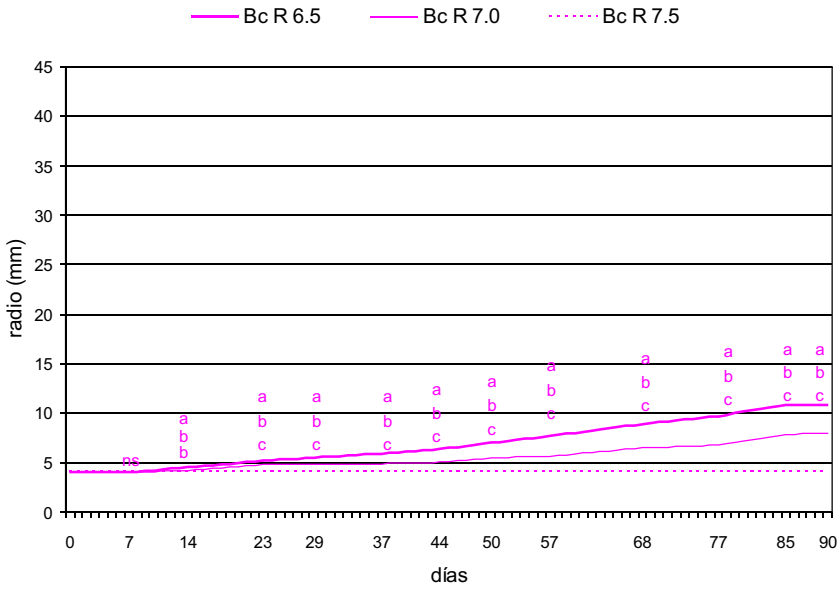


Fig. 22.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo Raper.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna;"Bi"- *Boletus badius* (Sarria); "R+nº"- medio de cultivo Raper y pH.

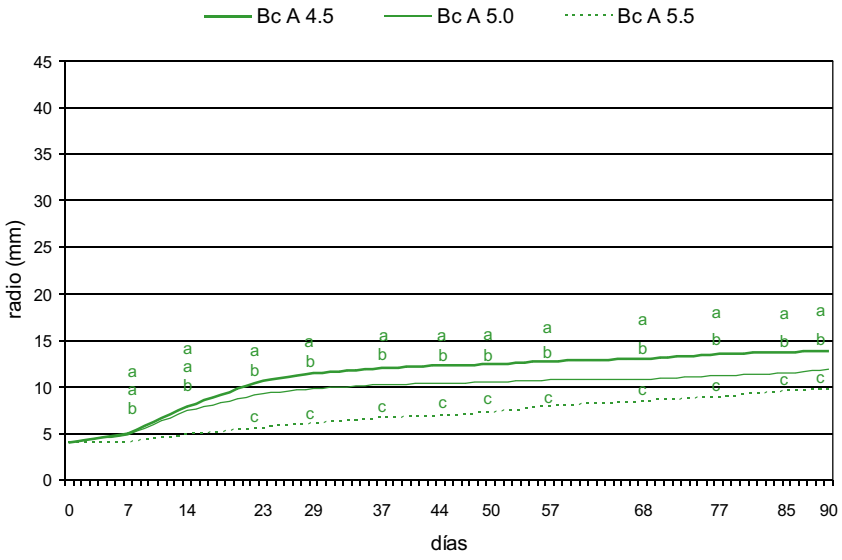


Fig. 23.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo Agar-malta 4%.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Bc"- *Boletus badius* (San Vicente); "A+nº"- medio de cultivo Agar- malta 4% y pH.

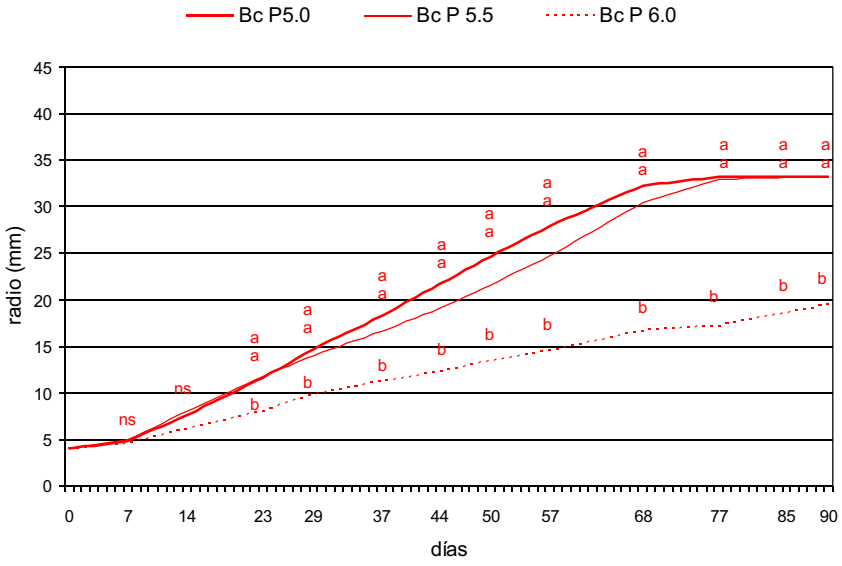


Fig. 24.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente) en medio de cultivo PDA.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Bc"- *Boletus badius* (San Vicente); "P+nº"- medio de cultivo PDA y pH.

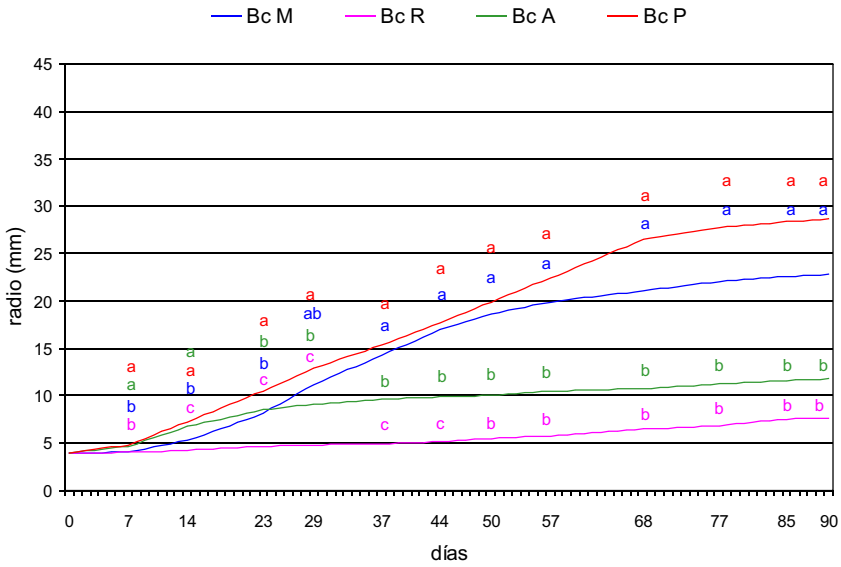


Fig. 25.- Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Boletus badius* (San Vicente).
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna "Bc"- *Boletus badius* (San Vicente); "M"- MMN; "R"- Raper; "A"- Agar-malta 4%; "P"- PDA.

desde amarillo (2 D) a crema (158 C) o verde grisáceo (197 B) y marrón distribuído irregularmente (concéntrico, zonado...). Con pH 7.5 todavía no había crecimiento a los 30 días y únicamente se percibían algunas colonias incipientes sobre el disco de siembra de color gris claro (156 B). A los 45 días ya adopta la morfología descrita, aunque con colonias de menor tamaño y con los colores más irregularmente distribuídos pero en ningún caso de forma concéntrica.

4.1.1.3.3. *Paxillus involutus* en agar-malta 4%

A los 15 días todavía no mostraban actividad alguna. A los 30 días muestran colonias muy irregulares por haberse desarrollado a partir de escasos puntos activos del disco de siembra. Tienen bordes precisos y un micelio grisáceo muy denso, hacia 156 B. Al envejecer se observan arrugas radiales, excepto en las de pH 5.5, y se torna más oscuro tirando a verdoso (197 C). Tiñe el medio alrededor del disco de inóculo a modo de aureola lo que le confiere un aspecto aceitoso. Se observan numerosos exudados diminutos sobre el punto de inoculación. Por el reverso muestra un color marrón oscuro (hacia 200 A). Tiñe el medio fuertemente de

color anaranjado (163 A). A los 45 días se observa un micelio aéreo, poco denso y de color gris-verde oliva, al anverso.

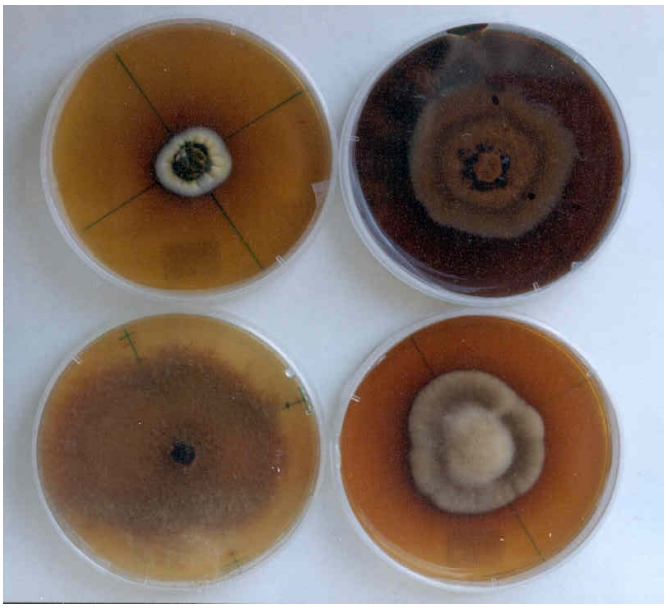


Foto 23. *Paxillus involutus*, a los 60 días. De izquierda a derecha y de arriba abajo: en Raper a pH 7.5, en PDA a pH = 5.5, en MMN a pH = 6.0 y en agar-malta a pH = 5.0.

4.1.1.3.4. *Paxillus involutus* en PDA

Los tres pH presentan una morfología similar. A los 15 días las colonias son regulares, sin micelio aéreo, bordes difusos. El inóculo se encuentra tapizado por un micelio aterciopelado a algodonoso y color marrón grisáceo. Fuera del punto de siembra toma una coloración homo génea marrón pardusca y textura lanosa muy densa salpicada como con motas de polvo. Por el reverso es de color pardo muy oscuro, prácticamente negro (202 B), con el margen más claro. Tiñe el medio de color tostado muy intenso cerca del inóculo (166 A) y más tenue en la periferia. Produce exudados alrededor del punto de siembra.

Foto 24. *Paxillus involutus*, en MMN, a pH = 6.0 (izq.) y en Raper a pH = 7.5 (dcha), a los 60 días.

A los 30 días, la colonia ha crecido considerablemente. Presenta un micelio denso, lanoso pulverulento de bordes difusos. Los exudados son mucho más abundantes. Por el reverso el color es pardo (199 A). Tiñe el medio de color tostado muy intenso cerca del inóculo (color 166 A) y más tenue en la periferia (163 A). Con el tiempo los márgenes de las colonias se harán más irregulares y el medio continuará oscureciéndose.

4.1.1.3.5. Crecimiento de *Paxillus involutus*

Paxillus involutus es el aislamiento que ha tenido los mejores crecimientos en casi todos los medios de cultivo. Dio las colonias de mayor tamaño con medio MMN sin ofrecer diferencias significativas a distintos pH (41,8 mm de radio medio); la velocidad de crecimiento fue muy elevada alcanzando el tamaño máximo a los 30 días aproximadamente (fig. 26). Con medio Raper también dio colonias de gran tamaño aunque la velocidad de crecimiento fue moderada, las colonias mayores crecieron a pH 6.5 (41,0 mm de radio medio), siendo significativamente superior que a pH 7.0 y 7.5 (33,9 y 30,9 mm de radio medio respectivamente) (fig. 27). En PDA mostró velocidades de crecimiento moderadas y las colonias alcanzaron el tamaño máximo a los 75 días aproximadamente (41,9 mm de radio medio); hubo diferencias significativas en cuanto a la velocidad de crecimiento pero no en cuanto al tamaño final; la cepa respondió mejor a pH 5.0 (fig. 29). El medio de cultivo que dio las colonias más pequeñas fue AM siendo, a pesar de todo, colonias de buen tamaño; respondió mejor a pH 4.5 (32,9 mm de radio medio) (fig. 28).

4.1.1.4. *Laccaria laccata*

4.1.1.4.1. *Laccaria laccata* en MMN

La morfología es común para todos los pH (fotos 25 y 26). A los 15 días las colonias son circulares y con bordes difusos. El micelio es de color grisáceo (156 D), formado por superposición de hifas largas, hialinas, rectilíneas, que crecen radial pero desordenadamente y pegadas al medio. Se observan mejor por reflexión. Las colonias son muy densas en el centro debido a la superposición de hifas. Por el reverso, se observa una aureola malva alrededor del disco de siembra (85 A – 85 B). Sin micelio aéreo.

Tabla 17.- Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Paxillus involutus* para los diferentes medios de cultivo

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	Paxillus involutus **RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
MMN 5.0	6,700 a	20,617 a	33,050 a	37,367 a	40,867 a	41,750 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a
MMN 5.5	7,033 a	18,183 a	29,267 b	35,167 a	39,933 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a
MMN 6.0	6,933 a	18,050 a	30,483 b	35,483 a	40,633 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a
MDS	0,707	2,282	4,787	3,608	1,615	1,046	1,050	1,050	1,050	1,050	1,050	1,050
RAPER 6.5	4,367 a	5,183 a	10,050 a	13,433 a	17,333 a	21,183 a	24,883 a	30,133 a	37,783 a	38,717 a	40,246 a	40,996 a
RAPER 7.0	4,000 a	4,000 a	4,400 b	6,200 b	9,200 b	12,550 b	15,683 b	20,133 b	28,117 ab	32,067 ab	33,558 a	33,938 a
RAPER 7.5	4,000 a	4,000 a	4,000 b	4,383 b	5,800 b	8,183 b	10,950 b	14,533 b	21,450 b	25,167 b	29,204 a	30,867 a
MDS	0,512	1,202	0,958	2,527	3,674	4,764	5,876	7,633	10,010	10,910	11,142	11,256
AM 4.5	4,083 a	4,483 a	5,583 a	8,483 a	12,700 a	16,550 a	19,783 a	24,233 a	31,100 a	32,900 a	32,883 a	32,933 a
AM 5.0	4,067 a	4,233 a	5,267 a	7,500 a	11,533 a	14,850 ab	17,750 ab	21,517 ab	26,300 ab	28,400 ab	27,354 ab	29,217 ab
AM 5.5	4,083 a	4,383 a	5,517 a	7,150 a	10,450 a	13,317 b	15,567 b	18,133 b	21,600 b	23,550 b	23,729 b	23,729 b
MDS	0,159	0,557	1,444	2,147	2,256	2,469	3,501	4,848	6,474	7,103	7,236	7,865
PDA 5.0	4,367 a	10,783 a	19,933 a	23,383 a	28,033 a	30,783 a	32,767 a	34,200 a	38,800 a	41,917 a	41,913 a	41,913 a
PDA 5.5	4,717 a	10,667 a	16,217 ab	18,200 ab	20,900 b	24,117 b	26,550 b	29,400 ab	36,083 a	40,533 a	41,108 a	41,108 a
PDA 6.0	4,650 a	7,500 b	10,417 b	12,917 b	16,550 b	20,100 b	23,250 b	27,550 b	36,233 a	40,167 a	41,783 a	41,783 a
MDS	0,573	2,927	6,204	6,395	6,731	6,327	6,191	6,019	6,113	3,889	3,225	3,225
MMN	6,875 a	18,944 a	30,919 a	35,986 a	40,474 a	41,171 a	41,178 a	41,178 a	41,178 a	41,178 a	41,178 a	41,178 a
RAPER	4,117 c	4,392 c	6,146 c	8,000 c	10,765 c	13,963 c	17,161 c	21,590 c	29,119 b	31,967 b	34,336 b	35,267 b
AM	4,071 c	4,367 c	5,449 c	7,704 c	11,546 c	14,693 c	17,407 c	20,813 c	25,867 b	27,763 b	27,989 c	28,626 c
PDA	4,565 b	9,638 b	15,513 b	18,158 b	21,811 b	24,985 b	27,515 b	30,389 b	37,031 a	40,850 a	41,601 a	41,601 a

Tabla 18.- Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Paxillus involutus*

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	Paxillus involutus **RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
AM 4.5	4,083 c	4,483 e	5,583 d	8,483 e	12,700 e	16,550 de	19,783 de	24,233 de	31,100 bc	32,900 bc	32,883 b	32,933 b
AM 5.0	4,067 c	4,233 e	5,267 d	7,500 e	11,533 e	14,850 e	17,750 e	21,517 ef	26,300 cd	28,400 cd	27,354 bc	29,217 bc
AM 5.5	4,083 c	4,383 e	5,517 d	7,150 e	10,450 e	13,317 e	15,567 e	18,133 fg	21,600 d	23,550 d	23,729 c	23,729 c
MMN 5.0	6,700 a	20,617 a	33,050 a	37,367 a	40,867 a	41,750 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a	41,783 a
MMN 5.5	7,033 a	18,183 b	29,267 a	35,167 a	39,933 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a	41,017 a
MMN 6.0	6,933 a	18,050 b	30,483 a	35,483 a	40,633 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a	40,783 a
PDA 5.0	4,367 bc	10,783 c	19,933 b	23,383 b	28,033 b	30,783 b	32,767 b	34,200 b	38,800 a	41,917 a	41,913 a	41,913 a
PDA 5.5	4,717 b	10,667 c	16,217 b	18,200 c	20,900 c	24,117 c	26,550 c	29,400 bcd	36,083 ab	40,533 a	41,108 a	41,108 a
PDA 6.0	4,650 b	7,500 d	10,417 c	12,917 d	16,550 d	20,100 cd	23,250 cd	27,550 cd	36,233 ab	40,167 a	41,783 a	41,783 a
RAPER 6.5	4,367 bc	5,183 e	10,050 c	13,433 d	17,333 cd	21,183 c	24,883 c	30,133 bc	37,783 ab	38,717 ab	40,246 a	40,996 a
RAPER 7.0	4,000 c	4,000 e	4,400 d	6,200 e	9,200 ef	12,550 e	15,683 e	20,133 ef	28,117 cd	32,067 bc	33,558 b	33,938 b
RAPER 7.5	4,000 c	4,000 e	4,000 d	4,383 e	5,800 f	8,183 f	10,950 f	14,533 g	21,450 d	25,167 d	29,204 bc	30,867 b
DMS	0,496	1,849	3,766	3,781	3,826	3,924	4,357	5,121	6,307	6,395	7,025	7,256

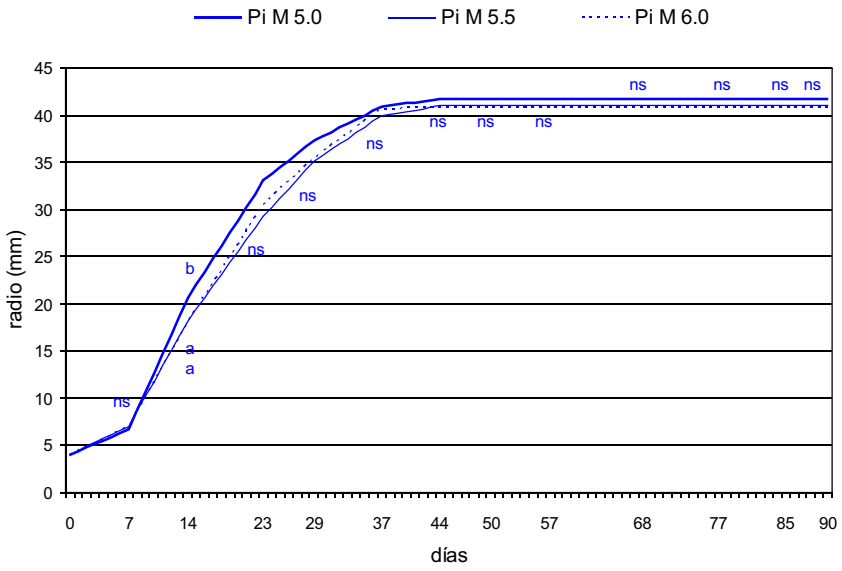


Fig. 26.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo MMN.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna;"Pi"- *Paxillus involutus*; "M+nº"- medio de cultivo MMN y pH.

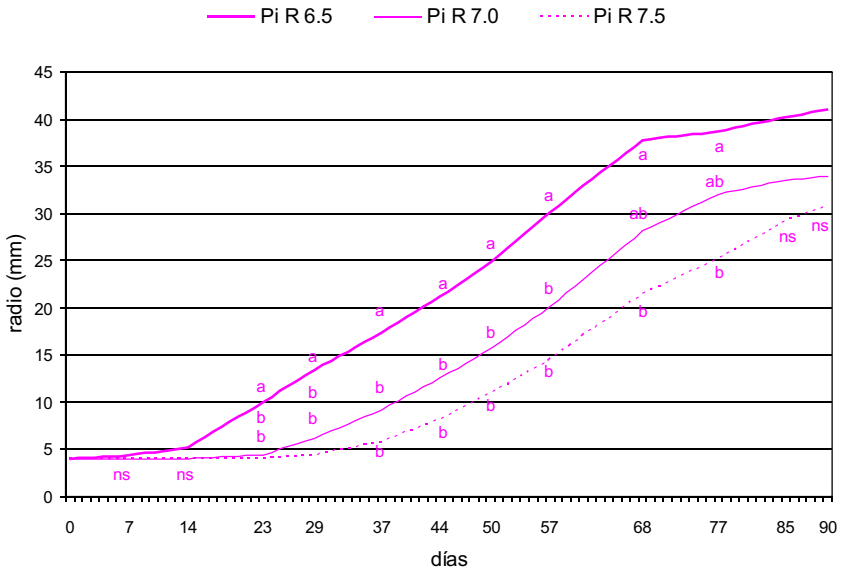


Fig. 27.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo Raper.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pi"- *Paxillus involutus*; "R+nº"- medio de cultivo Raper y pH.

Con formato: Derecha

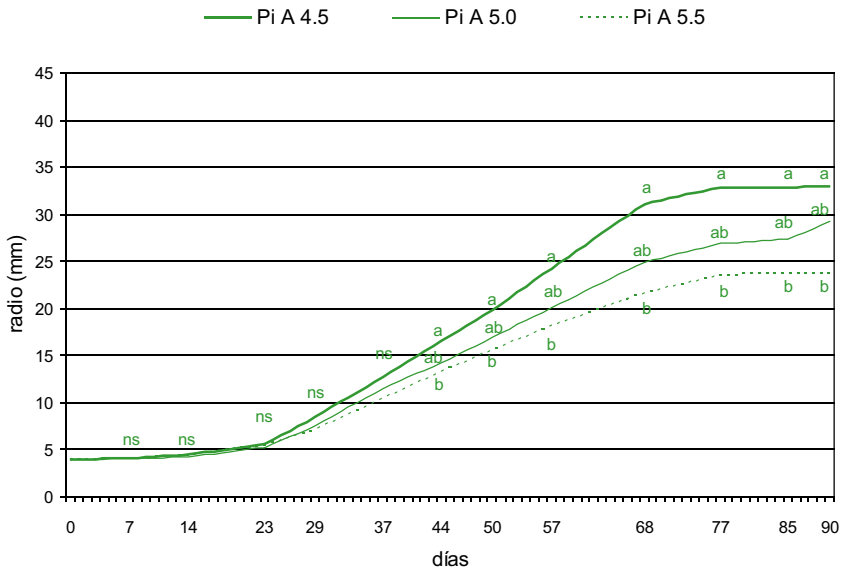


Fig. 28.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo Agar-malta 4%.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pi"- *Paxillus involutus*; "A+nº"- medio de cultivo Agar-malta 4% y pH.

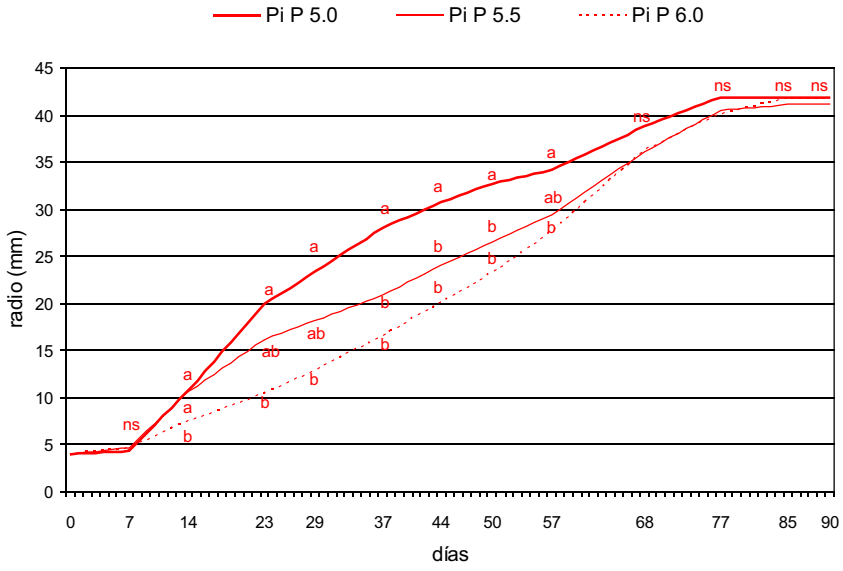


Fig. 29.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Paxillus involutus* en medio de cultivo PDA.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pi"- *Paxillus involutus*; "P+nº"- medio de cultivo PDA y pH.

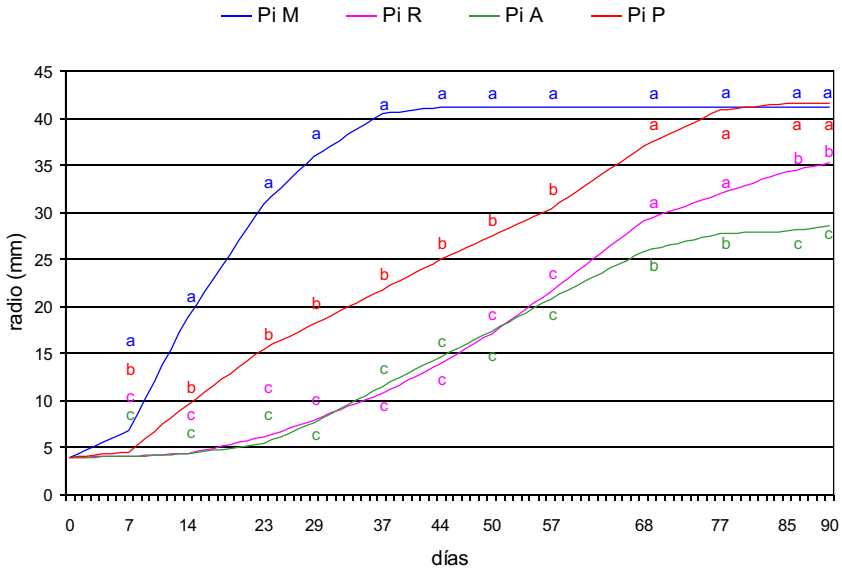


Fig. 30.- Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Paxillus involutus*.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "A"- representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pi"- *Paxillus involutus*; "M"- MMN; "R"- Raper; "A"- Agar-malta 4%; "P"- PDA.

A los 30 días exhibe un aspecto algodonoso. Se observan arrugas radiales con tonalidades tenuemente asalmonadas en las colonias más envejecidas así como micelio algodonoso pulverulento, no aceitoso, color violeta pálido (85 D). Todavía muestra por el reverso la coloración malva en la periferia del disco del inóculo pero considerablemente más oscuro, hacia violeta (94 B) que pierde intensidad con el tiempo volviéndose más claro (85 D).

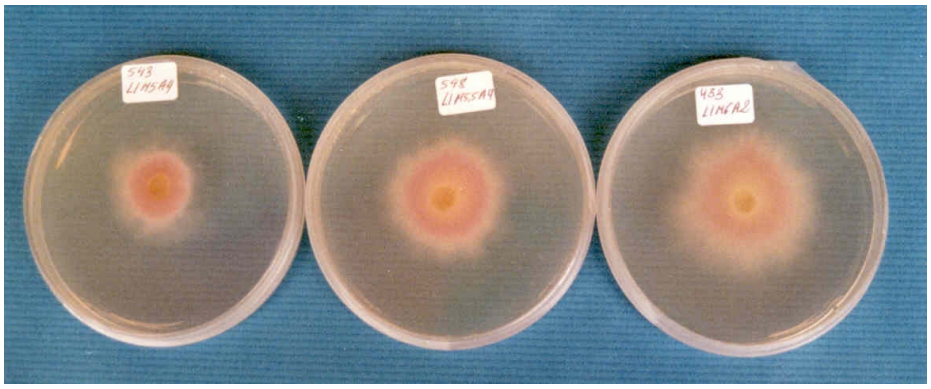


Foto 25. *Laccaria laccata*, en MMN, a los 30 días. De izquierda a derecha pH = 5.0, 5.5 y 6.0

A los 45 días presenta un gradiente de color en círculos concéntricos que disminuye de intensidad hacia el margen: cambia de amarillo grisáceo (161 C) en el centro a cremoso o blanco anaranjado (159 B) hacia el margen. Ha perdido la coloración malva o violeta y el micelio se ha vuelto aceitoso mostrando, a veces, costras aterciopeladas oleosas distribuídas irregularmente. Sin micelio aéreo.

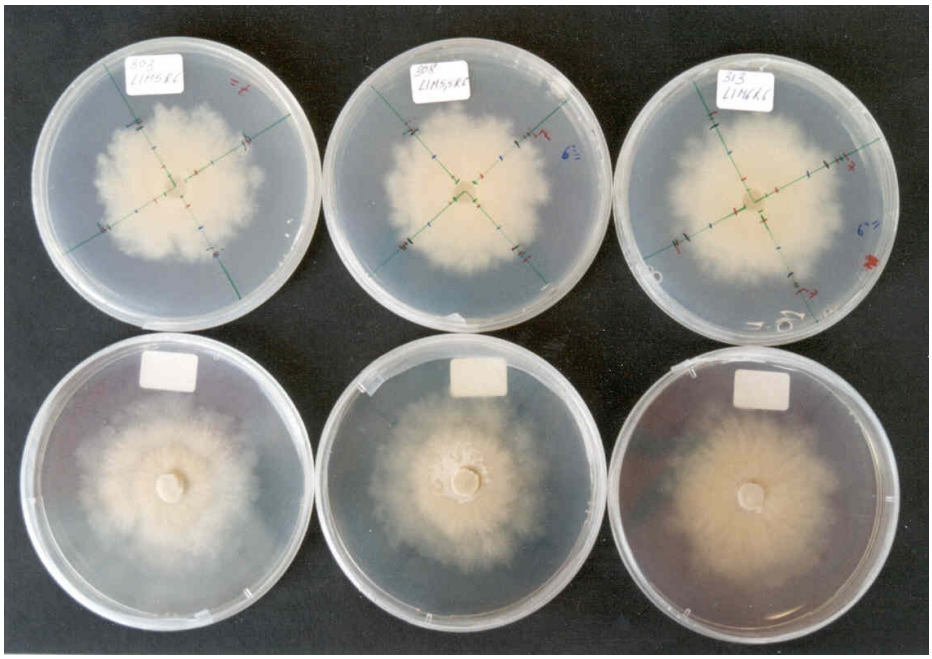


Foto 26. *Laccaria laccata*, en MMN, a los 60 días. De izquierda a derecha pH = 5.0, 5.5 y 6.0, reverso y anverso.

4.1.1.4.2. *Laccaria laccata* en Raper

A los 15 días todavía no había actividad. A los 30 días, se aprecia un crecimiento radial del micelio formando cordones ondulados de aspecto aceitoso, sin micelio aéreo y con bordes difusos constituído por hifas hialinas. Presenta algunas arrugas radiales de forma ondulada. Al reverso es de color blanquecino (155 A) sin cambios de tonalidad concéntricos (foto 27).

4.1.1.4.3. *Laccaria laccata* en agar-malta 4%

A los 15 días se observa el micelio formado por superposición de hifas largas, hialinas, rectilíneas, que se observan mejor por reflexión, creciendo radialmente, paralelas y muy ordenadas, pegadas al medio, formando abundantes cordones ondulados de hifas. De color blanquecino (155 A) al reverso. El crecimiento de la colonia es circular, de aspecto algodonoso y de bordes difusos. Sin micelio aéreo.

A los 45 días el micelio se vuelve más denso, agrupándose en cordones que discurren radialmente de forma más o menos ondulada y de aspecto aceitoso (foto 28).

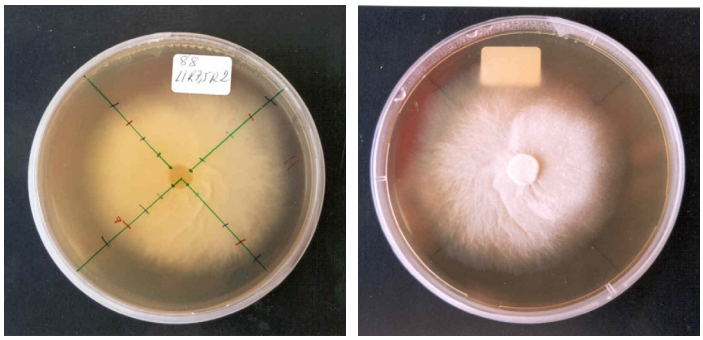


Foto 27. *Laccaria laccata*, en Raper, a pH = 7.5, a los 60 días. Reverso y anverso.

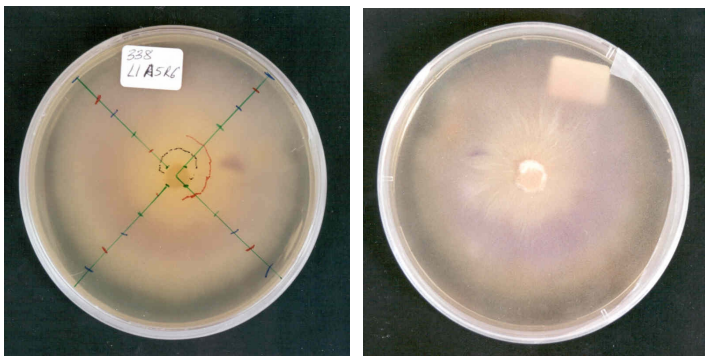


Foto 28. *Laccaria laccata*, en agar-malta, a pH = 5.0, a los 60 días. Reverso y anverso.

4.1.1.4.4. *Laccaria laccata* en PDA

Sólo se han desarrollado 3 colonias de las 18 repeticiones, y todas a pH 6.0, aunque aquellas que lo hicieron crecieron de forma rápida y alcanzando tamaños de colonia considerables.

A los 15 días, las 3 colonias que crecieron presentan un micelio muy poco denso de color blanquecino (155 A) al reverso. Se observan hifas hialinas, rectilíneas, individuales, más visibles por reflexión, que crecen radialmente pegadas al medio, con mayor densidad hacia el centro debido a la superposición de hifas y con aspecto de fibras sintéticas. El crecimiento de las colonias es circular y con bordes difusos. Sin micelio aéreo.

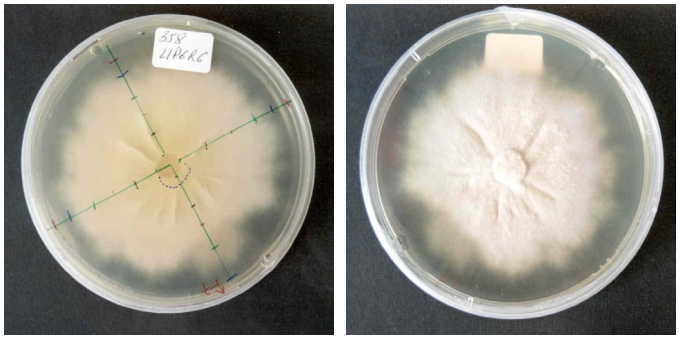


Foto 29. *Laccaria laccata*, en PDA, a pH = 6.0, a los 45 días. Reverso y anverso. Se observan las arrugas radiales y el aspecto pulverulento del micelio.

A los 30 días las hifas continúan creciendo radialmente y ya se han formado cordones ondulados, densos y de aspecto aceitoso. Por el reverso, las colonias son de color blanquecino (155 A) y sin cambios de tonalidad concéntricos.

A los 45 días los cordones descritos han evolucionado hacia arrugas radiales que desaparecen hacia el margen. El micelio adopta un aspecto aterciopelado cubierto por un diminuto micelio aéreo formado por hifas muy cortas que en ciertos puntos presenta acumulaciones más densas que le da un aspecto pulverulento (foto 29).

4.1.1.4.5. Crecimiento de *Laccaria laccata*

El crecimiento de *Laccaria laccata* fue en general muy variable. En muchos tratamientos sólo se llegaron a desarrollar 1 ó ninguna de las 6 repeticiones. El único medio en que crecieron todas las colonias de cada tratamiento fue MMN, obteniéndose los mayores tamaños a pH 6.0 (37,1 mm de radio medio) (fig. 31).

4.1.1.5. *Pisolithus tinctorius*

4.1.1.5.1. *Pisolithus tinctorius* en MMN

Únicamente se observó alguna actividad al cabo de 45 días en dos placas de pH 5.0 y cuatro placas de pH 6.0, dando colonias regulares a pH 5.0 e irregulares a pH 6.0, con márgenes difusos, de color marrón oscuro (199 C). Desarrolla colonias de color marrón oscuro (200 C más oscuro) al reverso, y más claro en el margen (199 A).

Tabla 19.- Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Laccaria laccata* para los diferentes medios de cultivo

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	Laccaria laccata **RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
MMN 5.0	6,233 a	12,800 b	22,183 a	25,117 b	26,350 b	26,767 b	26,900 b	26,900 b	26,900 b	26,900 b	27,096 c	27,096 c
MMN 5.5	6,800 a	15,533 a	23,950 a	26,317 b	27,217 b	27,700 b	28,333 b	28,800 b	28,817 b	29,083 b	30,650 b	30,692 b
MMN 6.0	6,683 a	16,717 a	26,667 a	30,533 a	32,700 a	33,267 a	33,867 a	35,583 a	35,583 a	35,983 a	36,950 a	37,113 a
DMS	1,299	1,634	2,243	2,749	3,099	3,244	3,180	3,517	3,524	3,322	3,256	3,369
RAPER 6.5	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,350 a	5,133 a	6,133 a	7,167 a	9,233 a	10,133 a	10,350 a	10,350 a
RAPER 7.0	4,000 a	4,000 a	4,133 a	5,433 a	7,650 a	9,917 a	10,467 a	10,467 a	10,467 a	10,467 a	10,467 a	10,467 a
RAPER 7.5	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,817 a	6,417 a	7,617 a	8,883 a	9,933 a	10,400 a	10,392 a	10,392 a
DMS	0,000	0,000	0,232	2,494	6,853	11,300	13,420	15,140	17,780	19,100	20,125	20,125
AM 4.5	4,000 a	4,000 a	4,133 b	4,317 b	4,733 b	5,483 a	6,283 a	7,550 a	10,100 a	10,100 a	10,100 a	10,100 a
AM 5.0	4,000 a	4,000 a	4,283 b	4,950 b	6,000 ab	7,533 a	8,650 a	9,900 a	10,367 a	10,367 a	10,367 a	10,367 a
AM 5.5	4,000 a	4,083 a	6,567 a	10,567 a	15,650 a	20,067 a	20,383 a	20,383 a	20,383 a	20,383 a	20,383 a	20,383 a
DMS	0,000	0,145	2,262	5,525	9,890	14,230	15,660	17,540	19,980	19,980	19,980	19,980
PDA 5.0	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 b	4,000 b
PDA 5.5	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 a	4,000 b	4,000 b
PDA 6.0	4,000 a	4,133 a	5,433 a	6,633 a	7,833 a	9,800 a	11,467 a	12,733 a	14,200 a	14,733 a	22,108 a	22,683 a
DMS	0,000	0,232	2,494	4,583	6,671	8,931	10,210	11,000	11,720	12,110	14,125	14,269
MMN	6,558 a	15,000 a	24,244 a	27,307 a	28,738 a	29,237 a	29,691 a	30,426 a	30,429 a	30,647 a	31,565 a	31,633 a
RAPER	4,000 b	4,000 b	4,046 b	4,475 b	5,606 b	7,153 b	8,074 b	8,839 b	9,881 b	10,332 b	10,403 b	10,403 b
AM	4,000 b	4,026 b	4,990 b	6,608 b	8,786 b	11,024 b	11,774 b	12,611 b	13,615 b	13,615 b	13,615 b	13,615 b
PDA	4,000 b	4,044 b	4,475 b	4,876 b	5,279 b	5,928 b	6,489 b	6,908 b	7,399 b	7,575 b	10,036 b	10,228 b
DMS	0,340	0,702	1,287	2,449	4,109	5,855	6,490	7,118	7,926	8,176	9,126	9,126

Tabla 20.- Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Laccaria laccata*

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	Laccaria laccata **RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
AM 4.5	4,000 b	4,000 d	4,133 d	4,317 d	4,733 c	5,483 c	6,283 d	7,550 cd	10,100 cd	10,100 c	10,100 c	10,100 cd
AM 5.0	4,000 b	4,000 d	4,283 d	4,950 d	6,000 c	7,533 c	8,650 cd	9,900 cd	10,367 cd	10,367 c	10,367 c	10,367 cd
AM 5.5	4,000 b	4,083 d	6,567 c	10,567 c	15,650 b	20,067 b	20,383 bc	20,383 bc	20,383 bc	20,383 bc	20,383 bc	20,383 bcd
MMN 5.0	6,233 a	12,800 c	22,183 b	25,117 b	26,350 a	26,767 ab	26,900 ab	26,900 ab	26,900 ab	26,900 ab	27,096 ab	27,096 abc
MMN 5.5	6,800 a	15,533 b	23,950 b	26,317 b	27,217 a	27,700 ab	28,333 ab	28,800 ab	28,817 ab	29,083 ab	30,650 ab	30,692 ab
MMN 6.0	6,683 a	16,717 a	26,667 a	30,533 a	32,700 a	33,267 a	33,867 a	35,583 a	35,583 a	35,983 a	36,950 a	37,113 a
PDA 5.0	4,000 b	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,000 c	4,000 c	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,000 c	4,000 c	4,000 d
PDA 5.5	4,000 b	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,000 c	4,000 c	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,000 c	4,000 c	4,000 d
PDA 6.0	4,000 b	4,133 d	5,433 cd	6,633 d	7,833 c	9,800 c	11,467 cd	12,733 cd	14,200 bcd	14,733 bc	22,108 bc	22,683 bcd
RAPER 6.5	4,000 b	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,350 c	5,133 c	6,133 d	7,167 cd	9,233 cd	10,133 c	10,350 c	10,350 cd
RAPER 7.0	4,000 b	4,000 d	4,133 d	5,433 d	7,650 c	9,917 c	10,467 cd	10,467 cd	10,467 cd	10,467 c	10,467 c	10,467 cd
RAPER 7.5	4,000 b	4,000 d	4,000 d	4,000 d	4,817 c	6,417 c	7,617 d	8,883 cd	9,933 cd	10,400 c	10,392 c	10,392 cd
DMS	0,610	0,778	1,902	3,792	6,546	9,620	10,900	12,150	13,800	14,250	14,526	14,705

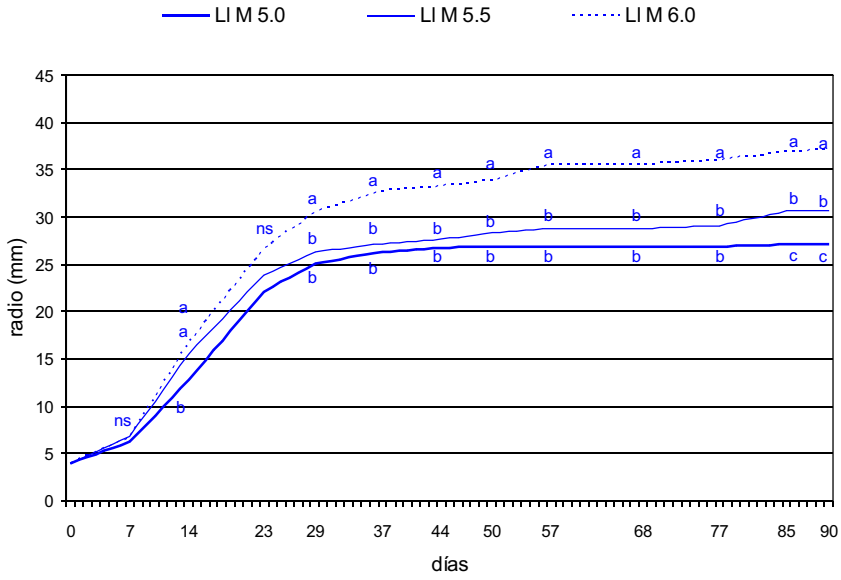


Fig. 31.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo MMN.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Ll"- *Laccaria laccata*; "M+nº"- medio de cultivo MMN y pH.

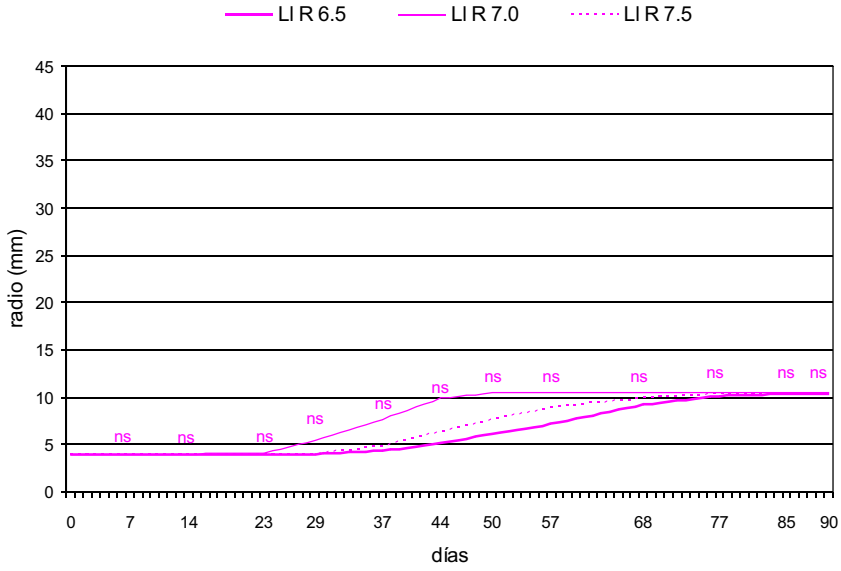


Fig. 32.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo Raper.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Ll"- *Laccaria laccata*; "R+nº"- medio de cultivo Raper y pH.

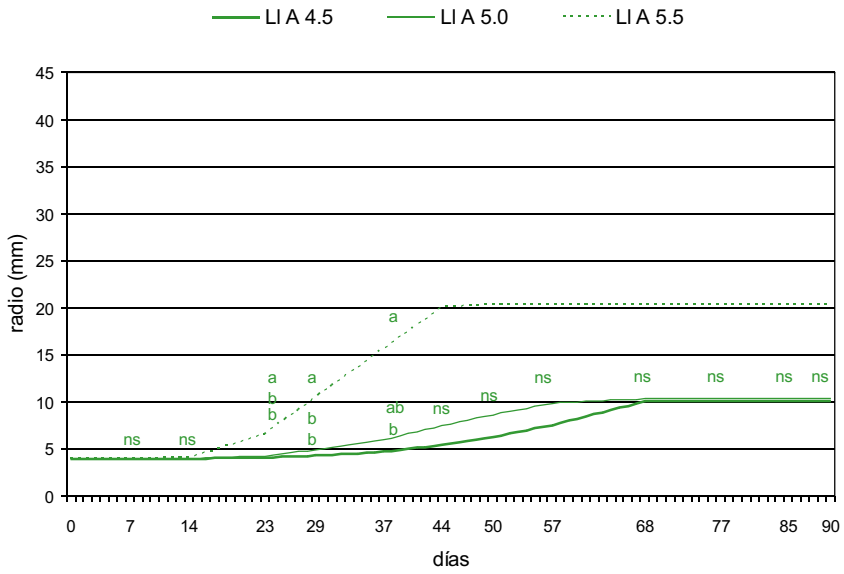


Fig. 33.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo Agar-malta 4%.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Ll"- *Laccaria laccata*; "A+nº"- medio de cultivo Agar-malta 4% y pH.

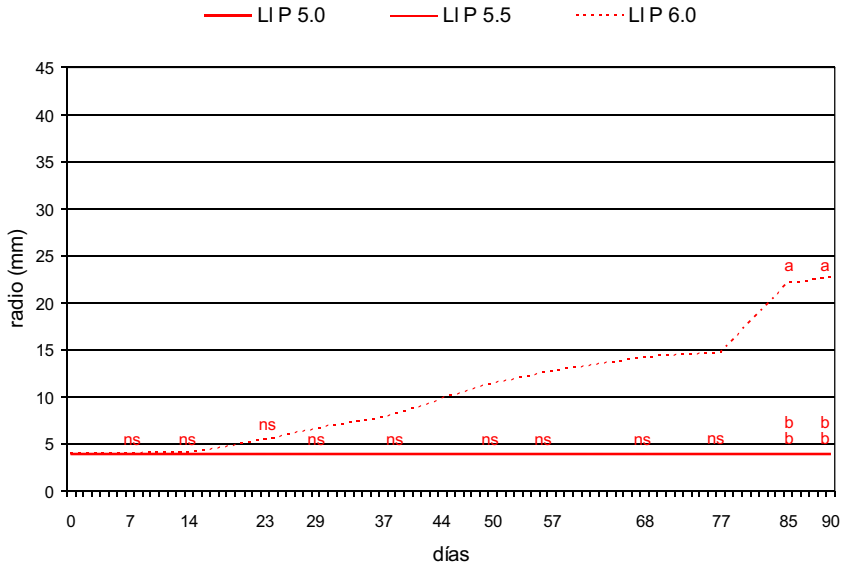


Fig. 34.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Laccaria laccata* en medio de cultivo PDA.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Ll"- *Laccaria laccata*; "P+nº"- medio de cultivo PDA y pH.

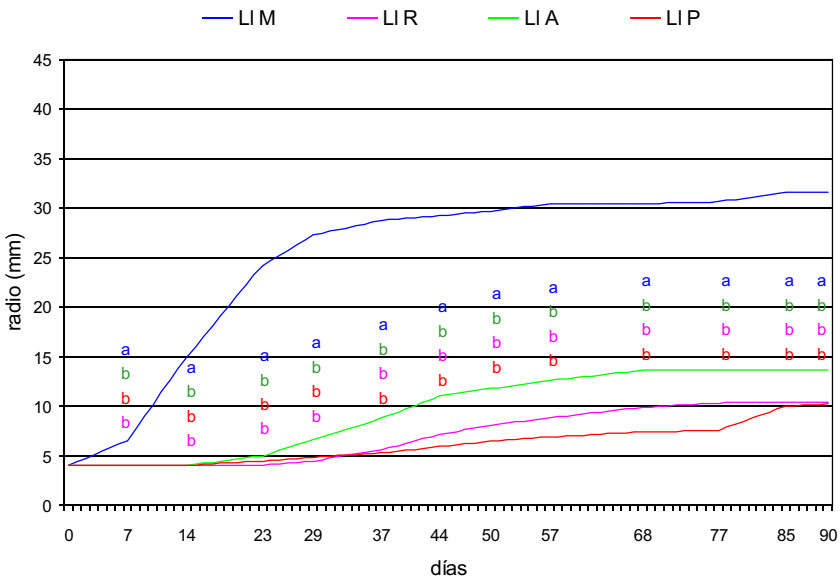


Fig. 35.- Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Laccaria laccata*.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan ($P<0.05$). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Ll"- *Laccaria laccata*; "M"- MMN; "R"- Raper; "A"- Agar-malta 4%; "P"- PDA.

4.1.1.5.2. *Pisolithus tinctorius* en Raper

Comienzan la actividad a los 15 días formando colonias con micelio amarillo verdoso (150 A) muy poco extendido en el agar. Más adelante la colonia toma una textura algodonoso-lanosa, con márgenes difusos, y el micelio se va oscureciendo tomando un tono amarillo verdoso más oscuro (151 A). Tiñe el medio de color anaranjado grisáceo (164 A), al trasluz.

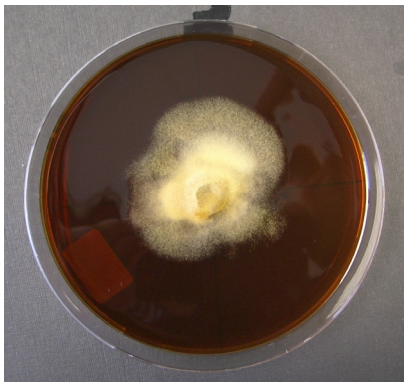


Foto 30. *Pisolithus tinctorius*, en Raper, a pH = 7.0, a los 60 días. Anverso.

4.1.1.5.3. *Pisolithus tinctorius* en agar-malta

A los 15 días, a pH 5.0, se observa un micelio aterciopelado en la superficie del disco de siembra. Tiñe el medio. Permanece en el mismo estado hasta los 45 días en que se observan colonias regulares de margen difuso, con micelio aéreo, poco denso, color grisáceo o amarillento-verdoso, dando una coloración

general amarilla (3 D), crema-gris-amarillenta (161 A) o gris pardusca (199 C más claro). Por el reverso es marrón oscuro en el centro (200 C más oscuro) y más claro en el margen (199 A).

A pH 5.5, a los 15 días, se aprecian colonias circulares muy pequeñas de micelio gris-marfil, con bordes difusos, sin micelio aéreo y de color crema-verdoso al reverso. Tiñe el medio muy tenuemente, gris amarillento (hacia 160 A).

A los 30 días las colonias toman un aspecto oleoso, crecen pegadas al medio con micelio aéreo muy laxo de color marrón claro (165 B).

4.1.1.5.4. *Pisolithus tinctorius* en PDA

A los 15 días se observa el disco de siembra tapizado por micelio poco denso, aterciopelado, con escaso crecimiento en el agar, de color café a marrón pardusco y de bordes difusos. Tiñe el medio de color tostado (163 A). Continúa con el mismo aspecto durante todo el periodo del ensayo.

4.1.1.5.5. Crecimiento de *Pisolithus tinctorius*

Se obtuvieron también crecimientos muy variables. Los cultivos más homogéneos fueron en PDA y AM, aunque en PDA el crecimiento fue prácticamente nulo (fig. 39) y en AM las colonias fueron muy pequeñas (radio medio final 12,8-17,9 mm aproximadamente) (fig. 38). En MMN el crecimiento fue también prácticamente nulo (fig. 36).

Tabla 21.- Influencia del pH sobre el radio de las colonias de *Pisolithus tinctorius* para los diferentes medios de cultivo

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto, "DMS".- diferencia mínima significativa

	Pisolithus tinctorius **RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
MMN 5.0	4,267 a	4,400 a	4,400 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a	4,433 a
MMN 5.5	4,183 a	4,317 a	4,550 a	4,633 a	4,767 a	4,800 a	4,800 a	4,800 a	4,800 a	4,800 a	4,800 a	4,800 a
MMN 6.0	4,267 a	4,533 a	5,783 a	5,950 a	6,033 a	6,033 a	6,033 a	6,033 a	6,033 a	6,033 a	6,033 a	6,033 a
DMS	0,514	0,745	2,012	2,220	2,283	2,294	2,294	2,294	2,294	2,294	2,294	2,294
RAPER 6.5	4,667 a	5,400 a	6,867 a	8,233 a	10,133 a	11,650 a	13,600 a	16,800 a	21,067 a	22,483 a	23,671 a	23,850 a
RAPER 7.0	4,683 a	5,083 a	5,967 a	6,700 a	7,500 a	8,300 a	9,133 a	10,267 a	12,133 a	13,350 a	13,992 a	14,325 a
RAPER 7.5	4,583 a	5,233 a	6,400 a	7,067 a	8,200 a	9,367 a	10,400 a	11,700 a	13,233 a	14,083 a	14,525 a	14,763 a
DMS	0,872	1,573	2,800	3,821	5,309	6,776	8,323	10,410	13,510	14,440	15,357	15,985
AM 4.5	4,200 b	4,333 c	4,333 c	4,383 c	4,483 c	4,683 a	5,267 b	6,250 b	8,067 a	9,933 a	11,871 a	12,813 a
AM 5.0	4,633 a	5,067 b	5,917 b	6,750 b	8,700 b	10,700 b	11,900 a	12,817 a	13,483 a	13,483 a	12,771 a	13,575 a
AM 5.5	4,900 a	6,167 a	8,567 a	10,033 a	11,967 a	12,983 b	13,583 a	14,383 a	15,517 a	16,517 a	17,596 a	17,883 a
DMS	0,428	0,716	1,434	2,030	2,883	3,620	4,514	5,639	7,459	9,309	10,256	11,099
PDA 5.0	4,133 b	5,117 a	5,700 a	5,733 a	5,733 a	5,733 a	5,733 a	5,733 a	5,733 a	5,733 b	5,721 b	5,721 b
PDA 5.5	4,250 b	5,217 a	5,283 a	5,500 a	5,500 a	5,500 a	5,500 a	5,500 a	5,717 a	5,900 b	6,338 b	6,892 b
PDA 6.0	4,467 a	5,450 a	5,717 a	5,800 a	5,800 a	5,800 a	5,900 a	6,133 a	7,567 a	8,567 a	9,150 a	9,346 a
DMS	0,312	0,475	0,899	0,902	0,902	0,902	0,918	1,072	1,993	2,304	2,402	2,406
MMN	4,292 bc	4,461 b	4,958 b	5,058 c	5,130 b	5,142 b	5,142 b	5,142 b	5,142 b	5,142 b	5,142 b	5,142 b
RAPER	4,643 a	5,239 a	6,404 a	7,324 a	8,601 a	9,769 a	11,041 a	12,904 a	15,479 a	16,633 a	17,396 a	17,646 a
AM	4,567 ab	5,183 a	6,254 a	7,054 ab	8,372 a	9,275 a	10,039 a	10,928 a	12,111 a	13,072 a	14,079 a	14,757 a
PDA	4,282 c	5,253 a	5,550 b	5,660 bc	5,660 b	5,660 b	5,697 b	5,774 b	6,324 b	6,718 b	7,069 b	7,319 b
DMS	0,311	0,561	1,172	1,520	2,011	2,432	2,855	3,448	4,370	4,776	4,995	5,126

Tabla 22.- Influencia de la combinación medio-pH sobre el radio de las colonias de *Pisolithus tinctorius*

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto.

DMS.- diferencia mínima significativa

	Pisolithus tinctorius **RADIO MEDIO**											
medio/pH	**día 7**	**día 14**	**día 23**	**día 29**	**día 37**	**día 44**	**día 50**	**día 57**	**día 68**	**día 77**	**día 85**	**día 90**
AM 4.5	4,200 b	4,333 c	4,333 c	4,383 c	4,483 e	4,683 d	5,267 bc	6,250 cd	8,067 bcde	9,933 bc	11,871 bc	12,813 bc
AM 5.0	4,633 ab	5,067 b	5,917 bc	6,750 bc	8,700 bc	10,700 ab	11,900 a	12,817 ab	13,483 abc	13,483 bc	12,771 bc	13,575 bc
AM 5.5	4,900 a	6,167 a	8,567 a	10,033 a	11,967 a	12,983 a	13,583 a	14,383 ab	15,517 ab	16,517 ab	17,596 ab	17,883 ab
MMN 5.0	4,267 b	4,400 bc	4,400 c	4,433 c	4,433 e	4,433 d	4,433 c	4,433 d	4,433 e	4,433 c	4,433 c	4,433 c
MMN 5.5	4,183 b	4,317 c	4,550 c	4,633 c	4,767 de	4,800 d	4,800 c	4,800 d	4,800 de	4,800 c	4,800 c	4,800 c
MMN 6.0	4,267 b	4,533 bc	5,783 bc	5,950 bc	6,033 cde	6,033 cd	6,033 bc	6,033 cd	6,033 cde	6,033 c	6,033 c	6,033 c
PDA 5.0	4,133 b	5,117 bc	5,700 bc	5,733 bc	5,733 cde	5,733 cd	5,733 bc	5,733 cd	5,733 cde	5,733 c	5,721 c	5,721 c
PDA 5.5	4,250 b	5,217 abc	5,283 bc	5,500 c	5,500 cde	5,500 cd	5,500 bc	5,500 cd	5,717 cde	5,900 c	6,338 c	6,892 c
PDA 6.0	4,467 ab	5,450 ab	5,717 bc	5,800 bc	5,800 cde	5,800 cd	5,900 bc	6,133 cd	7,567 bcde	8,567 bc	9,150 bc	9,346 bc
RAPER 6.5	4,667 ab	5,400 ab	6,867 ab	8,233 ab	10,133 ab	11,650 ab	13,600 a	16,800 a	21,067 a	22,483 a	23,671 a	23,850 a
RAPER 7.0	4,683 ab	5,083 bc	5,967 bc	6,700 bc	7,500 bcde	8,300 bcd	9,133 abc	10,267 bcd	12,133 bcde	13,350 bc	13,992 bc	14,325 bc
RAPER 7.5	4,583 ab	5,233 abc	6,400 bc	7,067 bc	8,200 bcd	9,367 abc	10,400 ab	11,700 abc	13,233 abcd	14,083 abc	14,525 abc	14,763 abc
DMS	0,536	0,911	1,802	2,321	3,060	3,786	4,592	5,683	7,381	8,204	8,695	9,026

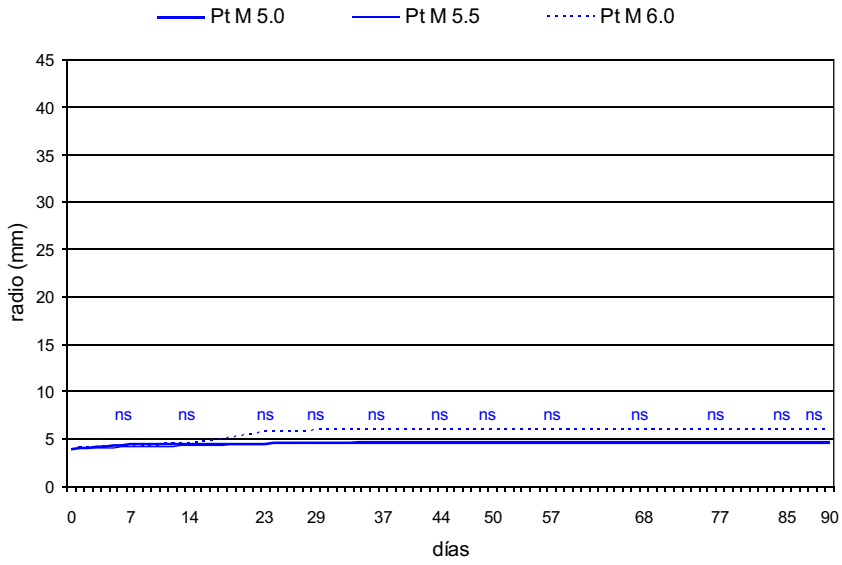


Fig. 36.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo MMN.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pt"- *Pisolithus tinctorius*; "M+nº"- medio de cultivo MMN y pH.

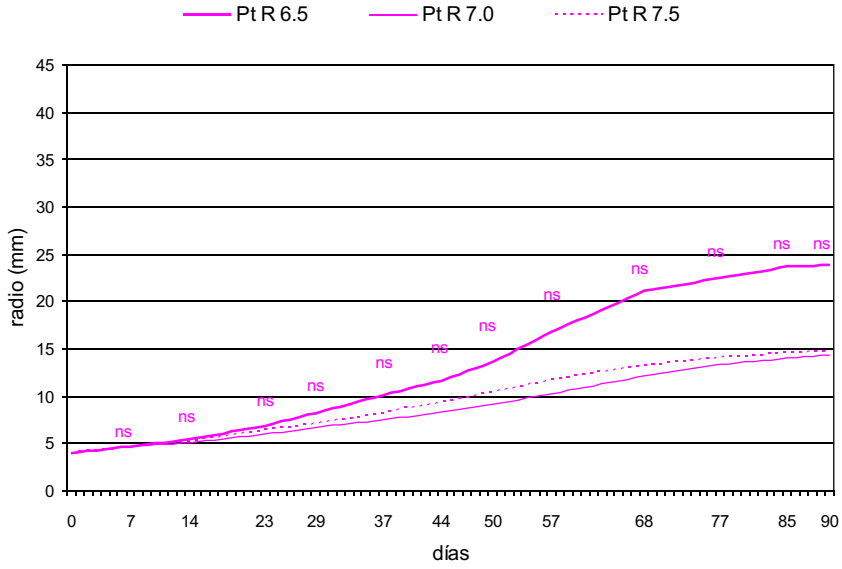


Fig. 37.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo Raper.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "A"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pt"- *Pisolithus tinctorius*; "R+nº"- medio de cultivo Raper y pH.

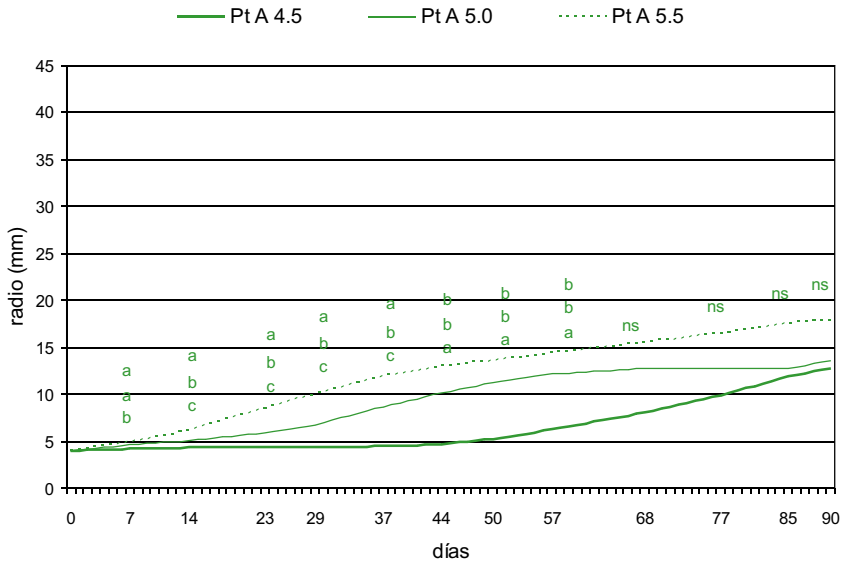


Fig. 38.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo Agar-malta 4%.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pt"- *Pisolithus tinctorius*; "A+nº"- medio de cultivo Agar-malta 4% y pH.

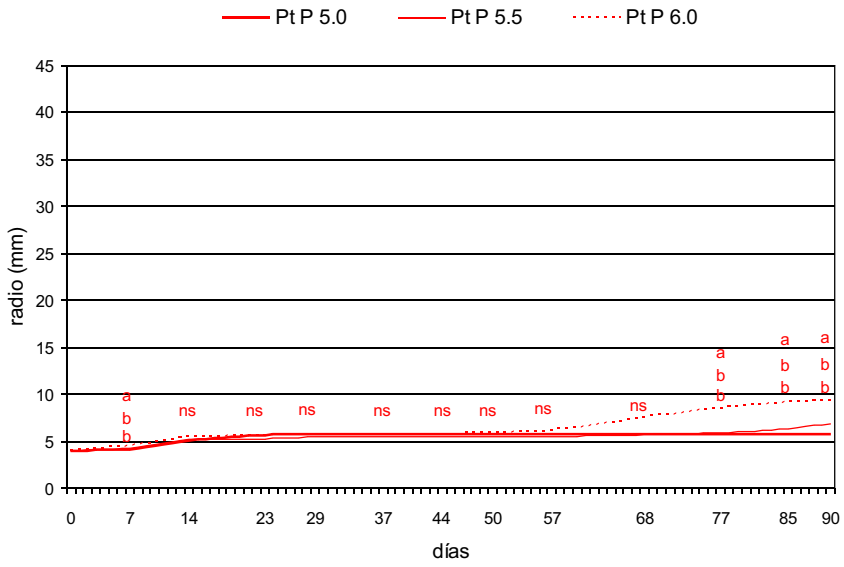


Fig. 39.- Influencia del pH sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medio de cultivo PDA.
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pt"- *Pisolithus tinctorius*; "P+nº"- medio de cultivo PDA y pH.

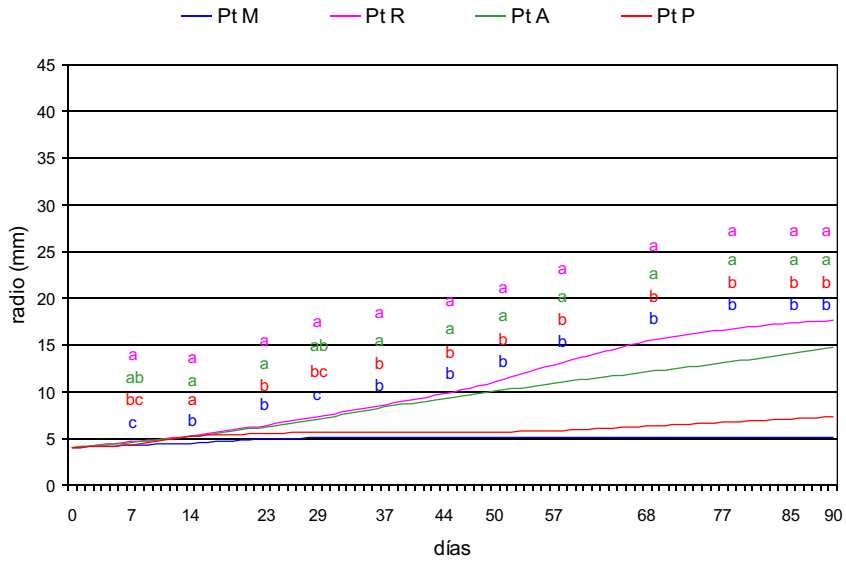


Fig. 40.- Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de *Pisolithus tinctorius.*
Diferentes letras dentro de la misma columna indica que existen diferencias significativas para el test de Duncan (P<0.05). "a"-representa el valor superior; "ns"- indica que no existen diferencias significativas dentro de esa columna; "Pt"- *Pisolithus tinctorius*; "M"- MMN; "R"- Raper; "A"- Agar-malta 4%; "P"- PDA.

Tabla 23. Tabla resumen de las descripciones morfológicas. Abreviaturas: A. algodonoso; a. color ambarino; At. aterciopelado; B. blanco; D. difuso; d. denso; L. lanoso; N. nítido; O. oleoso; P. pulverulento; p. pequeño; +. existe; -. no existe; (1). morfología nº 1; nº+letra. clave de color (RHS Colour Chart)

especie o cepa	medio de cultivo	pH	color del micelio	color del margen	color al reverso	micelio aéreo	textura	colorea medio	exudados	hendiduras radiales	margen
Boletus badius (Sarrià)	MMN	5,0	B	158D, 159D	11D, 158A, 159D	+	A, d	-	p	-	N
		5,5	B	158D, 159D	11D, 158A, 159D	+	A, d	-	p	-	N
		6,0	B	158D, 159D	158A, 159D	+	A, d	-	p	-	N
	Raper	6,5								-	
		7,0								-	
		7,5								-	
	Agar-malta	4,5	B	(1) 13D	(1)177A, 163A, 13D, 161C (2)165A, 164B	+	(1) A (2) At	-	p	-	N
		5,0	B		165A, 164B	-	At	-	-	-	N
		5,5	B		165A, 164B	-	At	-	-	-	N
	PDA	5,0	B	161C	161A, 161C	-	A	-	-	-	N
		5,5	B	161C	161A, 161C	-	A	-	-	-	N
		6,0	B	161C	161A	-	At	-	-	-	N
Boletus badius (S. Vicente Mar)	MMN	5,0	B	158D	158A, 158D, 162D	+	A, d	-	-	-	N
		5,5	B	158D	158A, 158D, 162D	+	A, d	-	-	-	N
		6,0	B	158D	158A, 158D, 162D	+	A, d	-	-	-	N
	Raper	6,5	B		162C	-	At, d	-	-	-	N
		7,0	B		162C	-	At	-	-	-	N
		7,5								-	
	Agar-malta	4,5	B	162D	160D, 162D	-	A, d	-	-	-	N
		5,0	B	162D	160D, 162D	-	A, d	-	-	-	N
		5,5	B	162D	160D, 162D	+	A, d	-	-	-	N
	PDA	5,0	B	199A	159C, 161C	-	A, d	-	p, a, T/163A	+	N
		5,5	B	161D	165A, 199A	-	A, d	-	p, a, T/163A	+	N
		6,0	B	161A	165A, 161D, 199A	-	A	-	p, a, T/163A	+	N
Laccaria laccata	MMN	5,0	85D, 94B, 156D, 165D		85A, 85B, 159B, 161C	-	A, O	-	-	-	D
		5,5	85D, 94B, 156D, 165D		85A, 85B, 159B, 161C	-	A, O	-	-	-	D
		6,0	85D, 94B, 156D, 165D		85A, 85B, 159B, 161C	-	A, O	-	-	-	D
	Raper	6,5	155A		155A	-	O	-	-	+	D
		7,0	155A		155A	-	O	-	-	+	D
		7,5	155A		155A	-	O	-	-	+	D
	Agar-malta	4,5	155A		155A	-	O	-	-	-	D
		5,0	90B, 155A		155A, 89B	-	O	-	-	-	D
		5,5	90B, 155A		155A, 89B	-	O	-	-	-	D
	PDA	5,0									
		5,5									
		6,0	155A		155A	p	A, P, O	-	-	+	D
Paxillus involutus	MMN	5,0		161A, 165B	200A, 165A, 165B	+	L, A, P	175A	-	-	D
		5,5		161A, 165B	200A, 165A, 165B	+	L, A, P	175A	-	-	D
		6,0		161A, 165B	200A, 165A, 165B	+	L, A, P	175A	-	-	D
	Raper	6,5	4D, 197D, 2D, 199A	198D	164B, 200A, 200C	p	L, A, P	164B	+	+	N
		7,0	4D, 197D, 2D, 158C, 197B	198D	164B, 200AC	-	L, A, P	+	+	-	N
		7,5	4D, 197D, 2D, 156B, 158C, 197B	198D	164B, 200AC	-	L, A, P	+	+	-	N
	Agar-malta	4,5	156B, 197C, 199A	165A	161A, 161B, 165A, 200A	+	L, O	163A	p	+	N
		5,0	156B, 197C, 199A	165A	161A, 161B, 165A, 200A	+	L, O	163A	p	+	N
		5,5	156B, 197C, 199A	165A	161A, 161B, 165A, 200A	+	L, O	163A	p	+	N
	PDA	5,0	199A		202B	+	L, A, P	163A, 166A	+	-	N
		5,5	199A		202B	+	L, A, P	163A, 166A	+	-	N
		6,0	199A		202B	+	L, A, P	163A, 166A	+	-	N
Pisolithus tinctorius	MMN	5,0				-					
		5,5	199C	199A	200C	-					D
		6,0	200B, 199A, 162C		199B	+					
	Raper	6,5	151A			+	A	+		-	D
		7,0	151A			+	A	+		-	D
		7,5	151A			+	A	+		-	D
	Agar-malta	4,5									
		5,0	3D, 161A, 199C	199A	200C	+	At			-	D
		5,5	199C	199A	160A, 199A	+	At, O	+	p	-	D
	PDA	5,0	199D		200A, 160B		At, P	163A	p	-	D
		5,5	199B, 199D		200A, 160B		At, P	163A	p	-	D
		6,0	160B, 199B, 199D		200A, 160B		At, P	163A	p	-	D

Foto 31.- RHS COLOUR CHART, carta de colores utilizada en la descripción de las colonia

4.2. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en suelo e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*

A continuación se detallan los datos de crecimiento y de micorrización para los diferentes orígenes de *Pinus pinaster* Ait. ensayados. En la tabla 24 se encuentran los resultados obtenidos.

El análisis de varianza se mostró altamente significativo ($P < 0,005$) entre parcelas, tratamientos de inoculación, procedencias y en la interacción parcela x tratamiento inoculación, mientras que no lo fue en la interacción inóculo x origen.

Entre procedencias hubo diferencias significativas en todas las variables determinadas excepto en los porcentajes de los morfotipos L14 y LN. Sin embargo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación en ninguna de las variables analizadas.

4.2.1. Peso seco de la parte aérea

Las plantas inoculadas con *Paxillus involutus* y con *Pisolithus tinctorius* fueron similares en cuanto al peso seco de la parte aérea a las plantas no inoculadas, no se detectaron diferencias significativas.

Sin embargo, hubo diferencias significativas entre orígenes. Los mayores pesos secos correspondieron a Meseta Castellana, Sierra de Gredos y "pino femia", con cifras del orden de 254 mg, mientras que los menores fueron Sierra de Oña y Sierra Bermeja, con pesos que no superaban los 200 mg (tabla 24).

4.2.2. Longitud de la parte aérea

La longitud de la parte aérea mostró un comportamiento similar al peso seco, sin diferencias entre las plantas inoculadas y el control y con diferencias significativas entre procedencias. "Femia" alcanzó la mayor altura de todos los orígenes (104,0 mm), seguida de Sierra de Gredos y Meseta Castellana (98,9 mm y 96,8 mm respectivamente). La procedencia de menor altura fue Sierra Bermeja (79,1 mm) seguida de Sierra de Oña (87,1 mm) y Sierras de Segura-Alcaraz (89,0 mm).

4.2.3. Relación entre la longitud y el peso seco de la parte aérea

Esta variable refleja la relación existente entre la altura y el tamaño de la parte aérea. Es una variable que se podría asimilar a la esbeltez, aunque en este caso, en vez de utilizar el diámetro del tallo se utiliza el peso seco. Cabe señalar que no se han recogido datos del diámetro del tallo puesto que, después de haber tomado gran número de medidas repetidas, se observó que había un elevado error que dependía de la presión ejercida por el pie de rey sobre el

tallo y de la altura a la que se tomara la medida, debido a la conicidad del tallo. Estos errores se incrementaban ya que las diferencias entre medidas eran a menudo del orden de décimas de milímetro, diferencias que podían ser debido a cualquiera de las razones mencionadas. Por consiguiente, se optó por definir una nueva relación, resultado del cociente entre la altura de la parte aérea en decímetros y su peso seco en gramos.

Valores altos de este cociente indicarían que la planta tiene una longitud elevada en comparación con su peso, mientras que valores bajos supondría lo contrario: plantas de escasa altura y elevado diámetro y/o superficie foliar.

No se han observado diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el control, aunque sí entre orígenes. La región de procedencia (origen) que alcanzó los valores más bajos fue Meseta Castellana (3,95) debido a su elevado peso seco, el mayor de todas las procedencias, y a su longitud intermedia. La que ha obtenido el valor mayor fue Oña (4,84) que, aunque no ha alcanzado longitudes elevadas, fue la procedencia que menor peso seco alcanzó. El resto de los orígenes tuvieron valores intermedios y similares entre sí.

4.2.4. Porcentaje de supervivencia

Todos los datos de porcentaje de supervivencia, relación porcentual entre las plantas que se mantuvieron vivas hasta la finalización del ensayo y la totalidad de las semillas sembradas, son valores a los que se le ha aplicado la transformación angular o arcoseno, para el tratamiento estadístico.

No se obtuvieron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el control. En cuanto al origen de las plantas, el "pino femia" tuvo la mayor tasa de supervivencia (20,77) seguida de Sierra de Oña, Meseta Castellana y Sierra de Gredos aunque sin apreciarse diferencias significativas entre ellas. Las peores procedencias fueron Sierra Bermeja (6,17), Sierras de Segura-Alcaraz (13,95) y Serranía de Cuenca (16,69).

4.2.5. Porcentaje de ápices micorrizados

Al igual que el porcentaje de supervivencia, los datos de porcentaje de micorrización, relación porcentual entre el número de raíces cortas micorrizadas y el número total de raíces cortas analizadas, fue corregido mediante la función arcoseno.

Tabla 24.- Influencia del tipo de inóculo y de la procedencia de las semillas de *P. pinaster* sobre el peso seco de la parte aérea (PS-PA) (mg); longitud de la parte aérea (LONG) (mm); relación entre longitud y el peso seco de la parte aérea (R-PA) (dm/g); supervivencia (SUPERV) (%); porcentaje de micorrización total (MIC) (%); porcentaje del micotipo L1 (MIC-L1) (%); porcentaje del micotipo L2 (MIC-L2) (%); porcentaje del micotipo L14 (MIC-L14) (%) y porcentaje del micotipo LN (MIC-LN) (%). Los valores de SUPERV, MIC, MIC-L1, MIC-L2, MIC-L14 y MIC-LN están transformados por la función "arcosen" ($\theta = \text{arcsen}\ (p)^{1/2}$). DMS.- diferencia mínima significativa.

INOCULO	PS-PA (mg)	LONG (mm)	R-PA (dm/g)	SUPERV	MIC	MIC-L1	MIC-L2	MIC-L14	MIC-LN
control	259.630 a	100.713 a	4.000 a	17.195 a	58.400 a	57.686 a	0.925 a	0.127 a	0.869 a
P. involutus	192.290 a	80.420 a	4.300 a	14.387 a	51.940 a	46.192 a	7.006 a	0.000 a	0.705 a
P. tinctorius	242.910 a	96.026 a	4.385 a	16.613 a	54.630 a	53.657 a	1.960 a	0.000 a	0.269 a
DMS	67.110	20.380	0.801	7.130	6.810	11.560	10.500	0.250	1.830

PROCEDENCIAS	PS-PA (mg)	LONG (mm)	R-PA (dm/g)	SUPERV	MIC	MIC-L1	MIC-L2	MIC-L14	MIC-LN
Sierra Bermeja	198.140 b	79.125 c	4.218 ab	6.166 d	47.870 b	39.107 b	10.261 a	0.000 a	1.226 a
Serranía de Cuenca	236.280 ab	91.802 abc	4.037 ab	16.686 bc	56.000 a	54.496 a	2.470 b	0.000 a	0.224 a
Noroeste, "femia"	254.170 a	104.019 a	4.261 ab	20.769 a	53.040 ab	51.776 a	2.589 b	0.000 a	0.596 a
Sierra de Gredos	253.910 a	98.903 ab	3.999 ab	17.521 abc	57.490 a	57.151 a	0.673 b	0.242 a	0.626 a
Meseta Castellana	254.670 a	96.753 ab	3.950 b	17.905 ab	54.930 ab	54.294 a	0.900 b	0.000 a	0.334 a
Sierra de Oña	188.900 b	87.077 bc	4.836 a	19.457 ab	60.120 a	58.369 a	2.777 b	0.000 a	0.320 a
Segura-Alcaraz	235.190 ab	89.026 bc	4.297 ab	13.953 c	55.490 a	52.388 a	3.407 ab	0.054 a	0.973 a
DMS	44.180	12.110	0.766	3.540	6.830	6.090	7.000	0.260	1.100

Nota: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a".- representa el valor más alto

El porcentaje de micorrización total, sin diferenciar morfotipos, fue similar para las plantas inoculadas y el control. Entre procedencias, la única que se distanció significativamente de las demás fue Sierra Bermeja, que tuvo el porcentaje de micorrización menor (47,87), mientras que el resto de las procedencias respondieron de una forma análoga. La procedencia que mayor valor alcanzó fue Sierra de Oña (60,12) aunque sin separarse significativamente del resto.

Se identificaron 4 morfotipos diferentes, nombrados como L1, L2, L14 y LN. L1 fue el más abundante y común a todos los tratamientos. L14 y LN tuvieron una presencia casi testimonial y L2, aún encontrándose en todas las procedencias, siempre lo hizo en muy baja proporción. Sin embargo, no presentaron diferencias significativas entre inóculos aunque sí entre orígenes.

4.2.5.1. Morfotipo L1

4.2.5.1.1. Morfología

Micorrizas de color marrón amarillento, las más jóvenes, a marrón más oscuro las más viejas, de superficie lisa brillante, a veces reticulada debido a la presencia de escasas hifas adheridas al manto exterior. Células corticales no visibles. Normalmente dicotómicas o doblemente dicotómicas que pueden llegar a formar estructuras coraloides, con terminaciones más o menos irrregulares o tortuosas. Manto externo plectenquimático. Sin partículas de suelo adheridas.

No se observa emanación de hifas, rizomorfos o esclerocios.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 2,3-2,5 mm

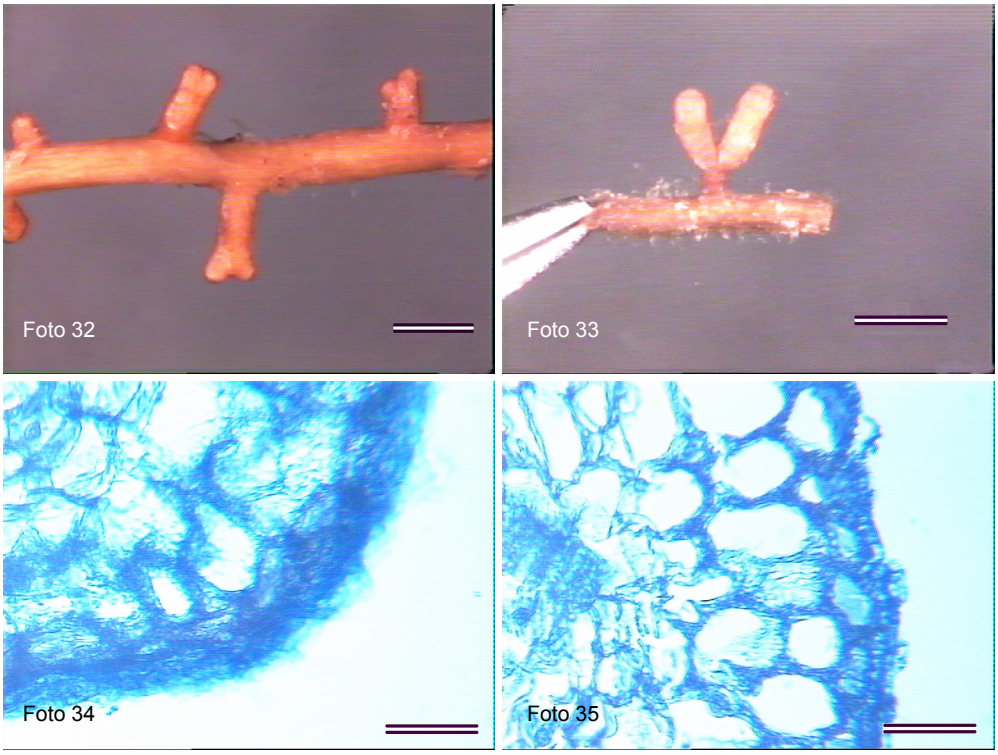
Diámetro del eje principal: 0,5 mm

Longitud de las terminaciones no ramificadas: 0,8-1,2 mm

Diámetro de las terminaciones no ramificadas: 0,3 mm

4.2.5.1.2. Presencia

Fue la micorriza más común. Se manifestó en todos los tratamientos y con una elevada presencia, con valores medios entre 39,11 y 58,37. No fueron detectadas diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el control, pero sí entre orígenes con un valor significativamente más bajo en Sierra Bermeja (39,11) frente al resto.



Fotos 32-35.- Morfotipo L1. Foto 32.- Micorriza en estado incipiente (marca: 1 mm). Foto 33.- Micorriza dicotómica (marca: 1 mm). Fotos 34 y 35.- Cortes transversales de una micorriza apreciándose la red de Hartig y el manto más (Foto 34) o menos grueso (Foto 35) (marca: 50 mm)

4.2.5.2. Morfotipo L2

4.2.5.2.1. Morfología

Micorrizas dicotómicas o doblemente dicotómicas, llegando a formar estructuras coraloides, de color marrón grisáceo o amarillento, más oscuras en las más viejas. Superficie lisa, brillante, células corticales no visibles. Frecuentemente con adherencias de partículas de suelo. Terminaciones regulares. Gran profusión de hifas de emanación y rizomorfos tipo "e" que crecen a partir de los extremos de las terminaciones micorrizadas, creando una estructura algodonosa alrededor de ellas. Manto plectenquimático. No se observan esclerocios ni cistidios.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 1,3-3,1 mm

Diámetro del eje principal: 0,6 mm

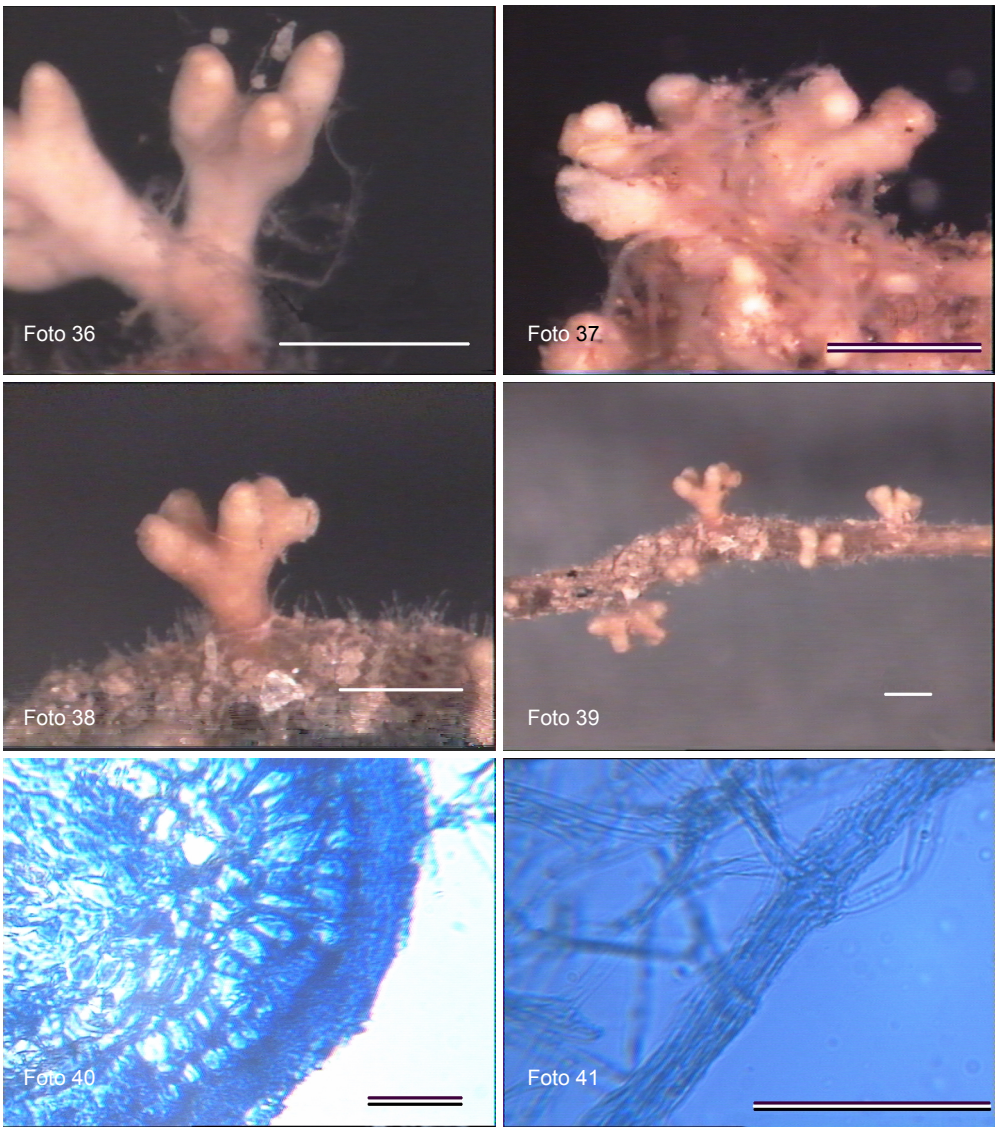
Longitud de las terminaciones no ramificadas: 0,2-0,4 mm

Diámetro de las terminaciones no ramificadas: 0,2 mm

4.2.5.2.2. Presencia

Se observó en gran número de tratamientos aunque en pequeño porcentaje. No hubo diferencias significativas entre plantas inoculadas y el control. Apareció con mayor frecuencia

en la procedencia de Sierra Bermeja (10,26), mientras que en el resto los valores oscilaron entre 0,67 y 3,41.



Fotos 36-41.- Morfotipo L2. Fotos 36-37.- micorriza con rizomorfos (marca: 1mm). Fotos 38-39.- micorriza (marca: 1mm) Foto 40.- Corte transversal de una micorriza apreciándose la red de Hartig y el manto (marca: 50 mm). Foto 41.- Rizomorfo (marca: 50 mm).

4.2.5.3. Morfotipo L14

4.2.5.3.1. Morfología

Micorrizas dicotómicas que forman pequeñas estructuras coraloides. Terminaciones algo tortuosas. De color marrón muy oscuro casi negro. Superficie lisa. Manto pseudoparenquimático en puzle con células epidermoides. No se observan hifas que emanan ni rizomorfos.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 1,8-2,2 mm

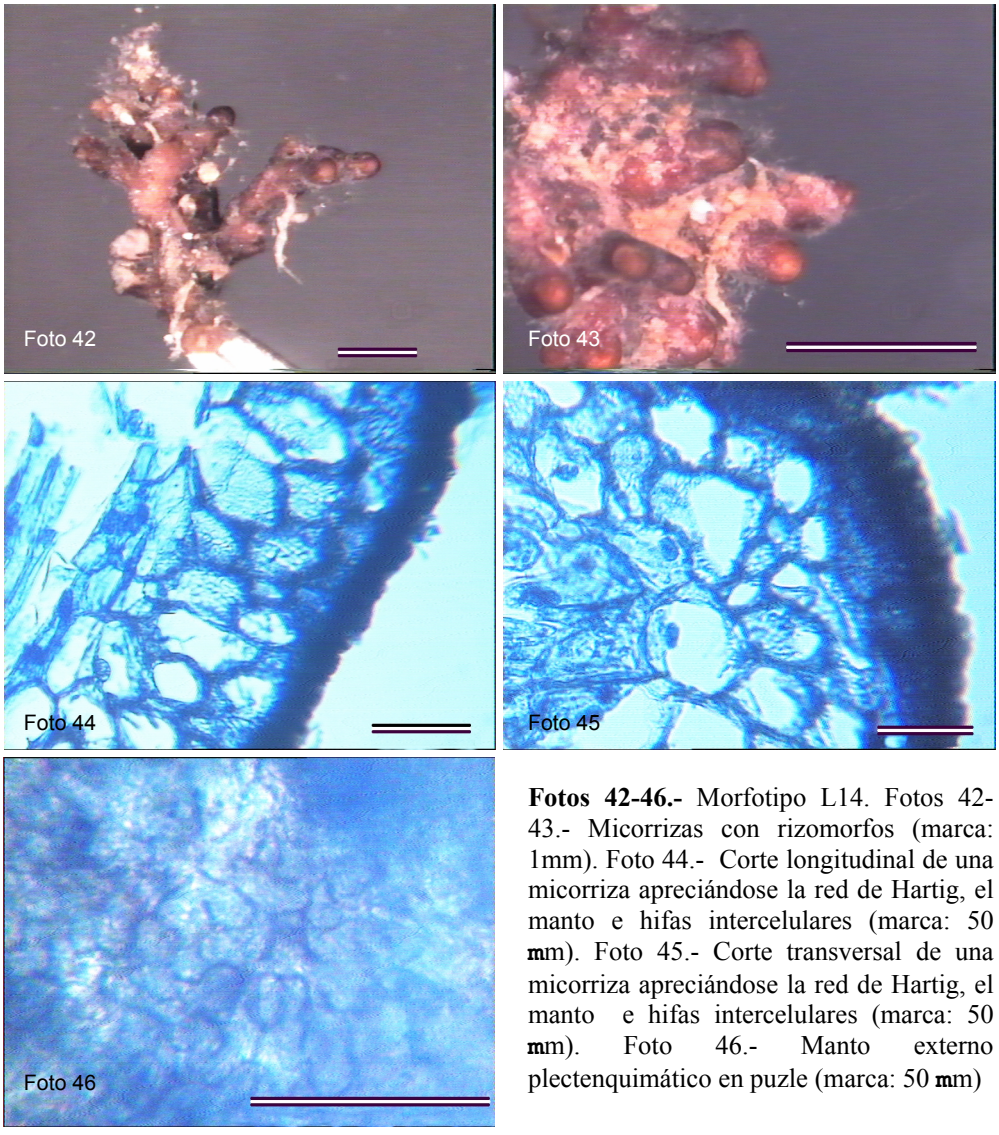
Diámetro del eje principal: 0,5-0,6 mm

Longitud de las terminaciones no ramificadas: 0,4-0,8 mm

Diámetro de las terminaciones no ramificadas: 0,2-0,4 mm

4.2.5.3.2. Presencia

Se detectó únicamente en plantas no inoculadas y sólo en dos procedencias, Sierra de Gredos y Segura-Alcaraz, aunque con una presencia tan escasa que no manifestaron diferencias significativas.



Fotos 42-46.- Morfotipo L14. Fotos 42-43.- Micorrizas con rizomorfos (marca: 1mm). Foto 44.- Corte longitudinal de una micorriza apreciándose la red de Hartig, el manto e hifas intercelulares (marca: 50 mm). Foto 45.- Corte transversal de una micorriza apreciándose la red de Hartig, el manto e hifas intercelulares (marca: 50 mm). Foto 46.- Manto externo plectenquimático en puzle (marca: 50 mm)

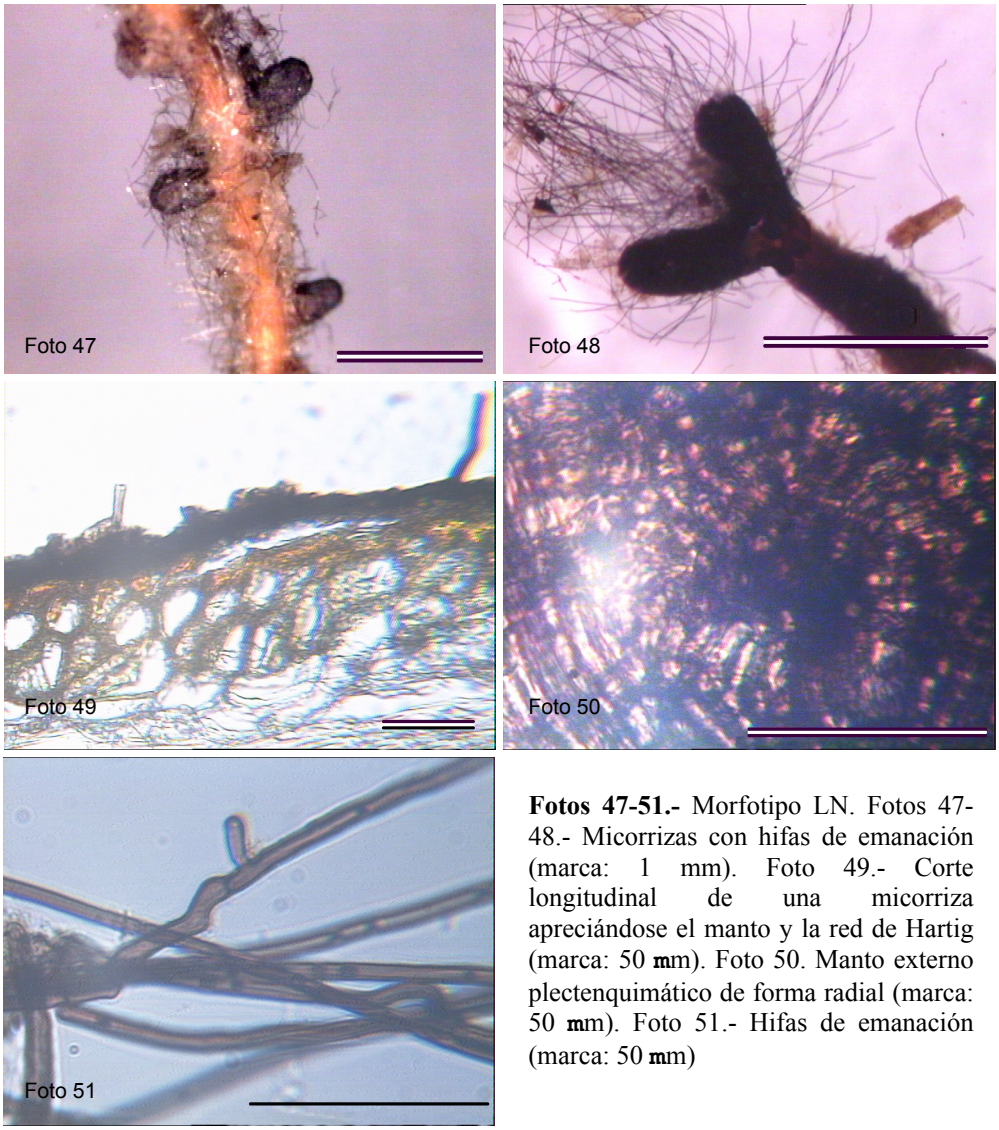
4.2.5.4. Morfotipo LN

4.2.5.4.1. Morfología

Micorrizas no ramificadas, simples en forma de maza, de color negro de aspecto brillante, con abundates hifas que emanan rectas, no ramificadas, muy oscuras y sin fíbulas. Manto externo plectenquimático con hifas dispuestas de forma radiada. No se han observado rizomorfos ni esclerocios.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 0,5-2,0 mm

Diámetro del eje principal: 0,2-0,4 mm



Fotos 47-51.- Morfotipo LN. Fotos 47-48.- Micorrizas con hifas de emanación (marca: 1 mm). Foto 49.- Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto y la red de Hartig (marca: 50 **m**m). Foto 50. Manto externo plectenquimático de forma radial (marca: 50 **m**m). Foto 51.- Hifas de emanación (marca: 50 **m**m)

Este morfotipo tiene unos caracteres lo suficientemente significativos como para identificarlo como *Cenococcum geophilum*. Se encuentra abundantemente descrito en la

literatura (Molina y Trappe, 1982; Agerer y Gronbach, 1988; Torres y Honrubia, 1997; Bradbury, 1998; Azul y Freitas, 1999; Baxter *et al.*, 1999; de Román y de Miguel, 2000)

4.2.5.4.2. Presencia

Su presencia fue muy escasa. No se encontraron diferencias significativas entre inóculos ni procedencias.

4.2.6. Relación entre porcentaje de ápices micorrizados y desarrollo de la parte aérea

Con el fin de estudiar el efecto de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas de *Pinus pinaster*, se han calculado los modelos de regresión lineal para porcentaje de ápices micorrizados-peso seco de la parte aérea y para porcentaje de ápices micorrizados-longitud de la parte aérea.

Se observa una tendencia general a obtener tamaños más elevados de la parte aérea cuanto mayor es el porcentaje de micorrización. Sin embargo, no todas las procedencias se comportan igual, e incluso se observa que los resultados difieren en función de la variable a analizar. Se observa que la procedencia de Oña responde a la inversa en cuanto a la altura de la parte aérea (menor altura a mayor porcentaje de micorrización) mientras que para el peso seco se muestra indiferente. En cuanto a Segura-Alcaraz, se advierte también una indiferencia en cuanto a la longitud, aunque sí se observa la tendencia normal en cuanto al peso seco de la parte aérea.

Es importante resaltar el bajo coeficiente de correlación en muchas de las procedencias ensayadas. Los índices de correlación mayores los obtuvieron Sierra Bermeja para la longitud (R^2 = 0,7949) y Meseta Castellana para el peso seco de la parte aérea (R^2 = 0,8393) con $P < 0,05$. Las procedencias que menor coeficiente de correlación tuvieron fueron Sierra de Oña y Sierras de Segura-Alcaraz (por debajo de 0,03) y con $P > 0,05$.

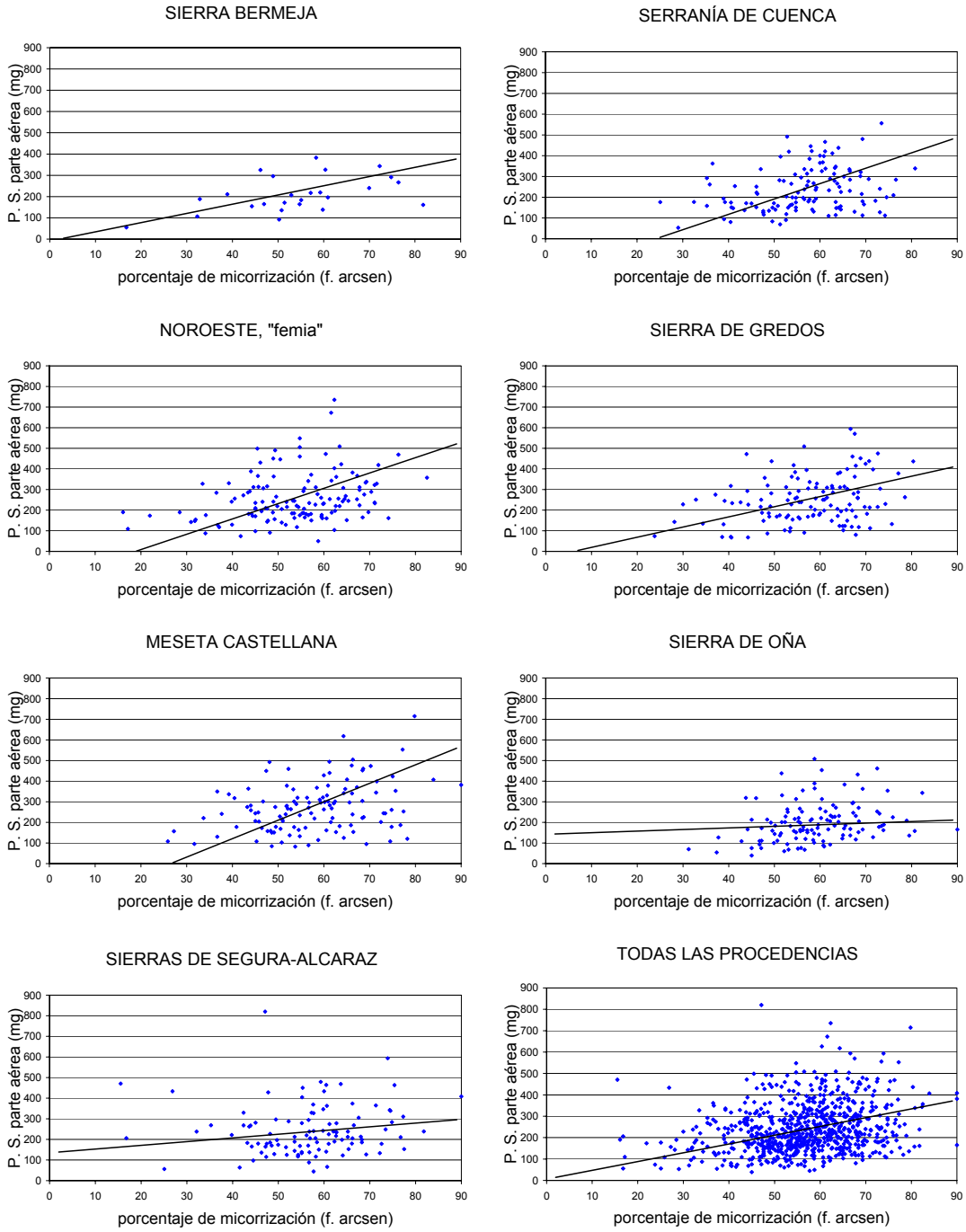


Fig. 41. Modelos de regresión para las distintas procedencias de *Pinus pinaster* Ait. (porcentaje micorrización / peso seco parte aérea).
- Sª Bermeja: $Y = 4{,}33218x - 9{,}23453$; $R^2 = 0{,}4826$; $P = 0{,}0122$
- S. de Cuenca: $Y = 7{,}40435x - 178{,}32564$; $R^2 = 0{,}4053$; $P = 0{,}0260$
- Noroeste, "femia": $Y = 7{,}43070x - 139{,}96012$; $R^2 = 0{,}3160$; $P = 0{,}0571$
- Sª de Gredos: $Y = 4{,}93341x - 29{,}69556$; $R^2 = 0{,}2047$; $P = 0{,}1397$
- Meseta Castellana: $Y = 8{,}94930x - 236{,}93533$; $R^2 = 0{,}8393$; $P < 0{,}0001$
- Sª. de Oña: $Y = 0{,}77465x + 142{,}33176$; $R^2 = 0{,}0107$; $P = 0{,}7485$
- Sª. Segura-Alcaraz: $Y = 1{,}80196x + 135{,}20543$; $R^2 = 0{,}0293$; $P = 0{,}5951$
- Todas las procedencias: $Y = 4{,}09841x + 6{,}23942$; $R^2 = 0{,}2286$; $P < 0{,}0001$

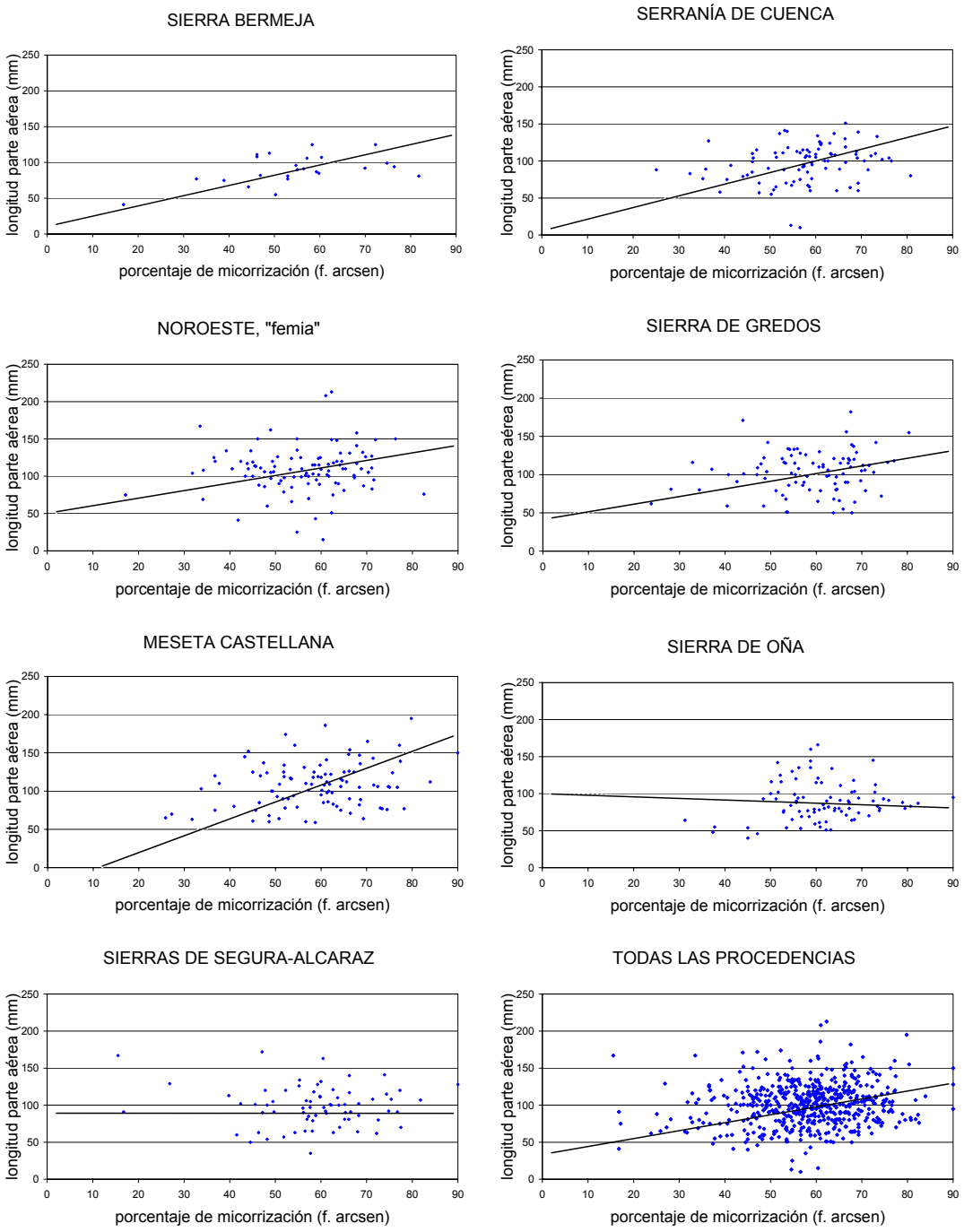


Fig. 42. Modelos de regresión para las distintas procedencias de *Pinus pinaster* Ait. (porcentaje micorrización / longitud parte aérea).
- Sª Bermeja: $Y = 1{,}43078x + 10{,}63654$; $R^2 = 0{,}7949$; $P < 0{,}0001$
- S. de Cuenca: $Y = 1{,}57539x + 3{,}58805$; $R^2 = 0{,}2910$; $P = 0{,}0703$
- Noroeste, "femia": $Y = 1{,}01124x + 50{,}38151$; $R^2 = 0{,}0897$; $P = 0{,}3442$
- Sª de Gredos: $Y = 0{,}99946x + 41{,}44747$; $R^2 = 0{,}0930$; $P = 0{,}3352$
- Meseta Castellana: $Y = 2{,}20631x - 24{,}44560$; $R^2 = 0{,}6341$; $P = 0{,}0019$
- Sª. de Oña: $Y = -0{,}21377x + 99{,}92780$; $R^2 = 0{,}0103$; $P = 0{,}7533$
- Sª. Segura-Alcaraz: $Y = -0{,}00308x + 89{,}19621$; $R^2 = 0{,}0000$; $P = 0{,}9965$
- Todas las procedencias: $Y = 1{,}07235x + 33{,}41814$; $R^2 = 0{,}2227$; $P < 0{,}0001$

4.3. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Aiton sembrados en contenedor utilizando técnicas convencionales de propagación de planta forestal e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*

4.3.1. Germinación

Como se puede apreciar en la figura 43 y en la tabla 25, donde se muestra la evolución de los porcentajes de germinación para los distintos orígenes de *Pinus pinaster*, se pueden distinguir tres patrones de germinación en las primeras 5 semanas desde la siembra. El primero, representado por semilla de las regiones de procedencia Segura-Alcaraz y Sierra Bermeja, se caracteriza por una elevada velocidad de germinación inicial. En este grupo destaca Sierra Bermeja que a las dos semanas (día 15) ya ha sobrepasado el 30 % de germinación, mientras que el resto de los orígenes (procedencias) presentan porcentajes que oscilan entre el 0 y el 3 %. Segura-Alcaraz mantiene una elevada velocidad de germinación hasta la quinta semana (día 36) en la que alcanza prácticamente el porcentaje final de germinación. El segundo grupo lo formarían las procedencias de Oña, Meseta Castellana, Serranía de Cuenca y Gredos, con una velocidad de germinación inicial intermedia, manteniendo el mismo ritmo hasta la séptima semana (día 50). El tercer grupo estaría representado por el origen gallego caracterizado por la velocidad de germinación inicial más lenta de todos los orígenes ensayados. A las cuatro semanas (día 29) su porcentaje de germinación era del 8 %, mientras que Segura-Alcaraz alcanzaba casi el 80 % y la media del segundo grupo era del 33 %.

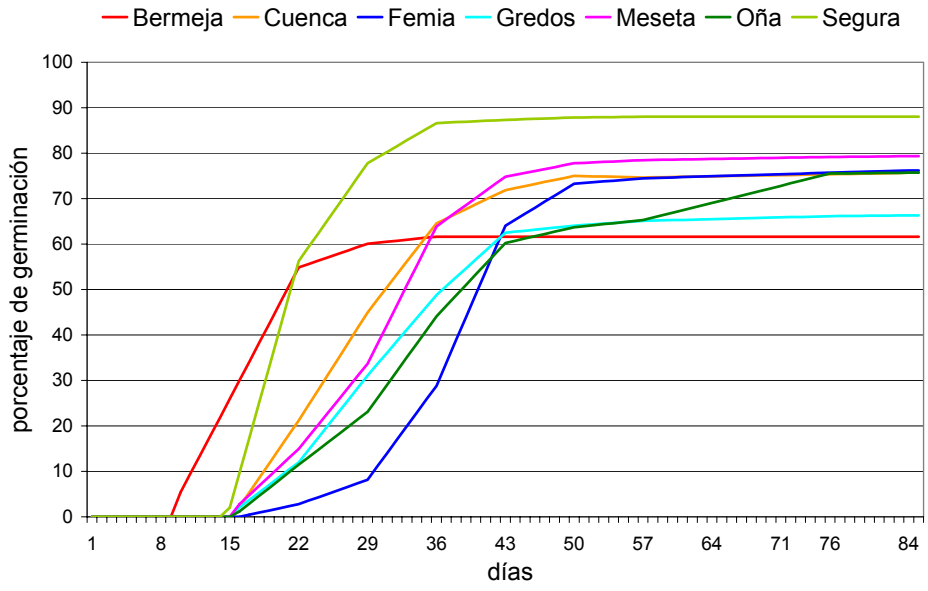


Fig. 43.- Evolución de la germinación de los 7 orígenes ensayados. El día 1 coincide con el día de siembra, realizada el 18 de marzo de 2004

Estos tres patrones de germinación se pueden apreciar también mediante la tabla 25. Se observa claramente la elevada velocidad de germinación de las procedencias de Sierra Bermeja y Segura-Alcaraz, que han alcanzado el 50 % de la germinación al cabo de 21 y 22 días de la siembra respectivamente (T-50), mientras que el resto de las procedencias necesitan entre 31 y 41 días. Si analizamos el porcentaje de semillas germinadas hasta el día 29 (primer tercio de la duración del ensayo) (P-1/3), observamos que Sierra Bermeja y Segura-Alcaraz alcanzan porcentajes de germinación de 60,1 y 78,0 % respectivamente, mientras que "femia" no llega al 8 % y el resto de los orígenes se encuentran entre el 22 y el 45 %.

Tabla 25.- Peso.- Peso de 1000 semillas en gramos; T-50.- tiempo transcurrido desde la siembra hasta alcanzar el 50% de germinación de las semillas sembradas; P-1/3.- porcentaje de germinación transcurrido el primer tercio de duración del ensayo, a los 29 días; P-f.- porcentaje de germinación al final del ensayo.

PROCEDENCIAS	peso	T-50	P-1/3	P-f
Sierra Bermeja	67,3	21	60,1	61,1
Serranía de Cuenca	54,7	31	45,0	75,7
Noroeste, "femia"	70,7	41	7,9	76,2
Sierra de Gredos	52,0	37	30,9	66,3
Meseta Castellana	63,3	33	33,3	79,3
Sierra de Oña	51,3	39	22,8	75,7
Segura-Alcaraz	65,3	22	78,0	88,0

Atendiendo al porcentaje de germinación final, se observaron diferencias significativas entre orígenes (tabla 26) y se podrían establecer 3 grupos diferentes. El primero, que está representado por la procedencia Segura-Alcaraz, es el que alcanza el porcentaje de germinación mayor (88,0 %). Al segundo grupo, con valores entre 75,7 y 79,3 %, pertenecen los orígenes de la Meseta Castellana, Oña, Serranía de Cuenca y el "pino femia" gallego. El tercer grupo, con los porcentajes de germinación más bajos, está representado por Sierra Bermeja y Gredos, con valores de 61,6 y 66,3 % respectivamente.

Tabla 26.- Influencia del origen de la semilla sobre la germinación. Los valores son los porcentajes de germinación acumulados en cada fecha, transformados por la función "arcosen" (θ = arcsen $(p)^{1/2}$). Las fechas son los días transcurridos desde la siembra. DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

	día 15	día 22	día 29	día 36	día 43	día 50	día 57	día 76	día 84
Sierra Bermeja	32,59 a	47,82 a	50,84 b	51,77 b	51,87 c	51,87 c	51,87 c	51,87 c	51,87 c
Serranía de Cuenca	7,54 c	27,38 b	42,11 c	53,48 b	57,99 b	60,04 b	60,04 b	60,38 b	60,62 b
Noroeste, "femia"	0,00 d	8,35 d	16,30 f	32,39 d	53,19 c	58,94 b	59,75 b	60,59 b	60,95 b
Sierra de Gredos	6,66 c	19,98 c	33,79 d	44,29 c	52,33 c	53,55 c	54,07 c	54,62 c	54,72 c
Meseta Castellana	8,32 c	22,11 c	35,27 d	53,16 b	59,95 b	61,99 b	62,64 b	63,16 b	63,28 b
Sierra de Oña	5,70 cd	19,53 c	28,54 e	41,57 c	50,98 c	53,17 c	53,99 c	60,48 b	60,59 b
Segura-Alcaraz	17,74 b	48,63 a	62,01 a	68,66 a	69,23 a	69,70 a	69,85 a	69,85 a	69,85 a
DMS	6,17	5,17	4,64	4,29	3,97	4,61	4,58	4,56	4,55

Son resaltables ciertas peculiaridades observadas en algunas procedencias como el elevado porcentaje de plántulas albinas aparecidas en las semillas de "pino femia" (2,4 %), mientras que en el resto de las procedencias no apareció ningún caso, o el alto porcentaje de plántulas de Sierra Bermeja con dificultades para abrir el tegumento externo de la semilla, llegando a producir la necrosis de los ápices cotiledonares (3,4 %).

Fotos 52-54.- Plántula de "pino femia" albina (Foto 52); plántula de Sierra Bermeja, caracterizada por la dificultad de apertura de la semilla (Foto 53) y daños ocasionados (Foto 54)

4.3.2. Variación del crecimiento a lo largo del ensayo

A nivel general, basándonos en la evolución del crecimiento en altura de la parte aérea, se han detectado tres hechos puntuales comunes a la mayoría de los tratamientos: (1) una parada de crecimiento entre la tercera y cuarta quincena después de la siembra seguida de (2) una fase de máximo crecimiento que dura hasta la sexta quincena, momento en que se traslada la planta al exterior y sufre (3) una ralentización paulatina del crecimiento en altura hasta que se vuelve prácticamente nulo en la quincena 11 (fig. 44).

La fecha de la primera fase depende estrechamente del proceso de germinación y tiene lugar entre las 5 y 9 semanas siguientes después de la siembra, cuando se ha sobrepasado el 80 % del porcentaje de germinación. Este hecho se refleja en un adelanto de 15 días en el crecimiento de Sierra Bermeja y Segura-Alcaraz respecto al resto de las procedencias ensayadas.

4.3.2.1. Crecimiento por orígenes

Los incrementos de crecimientos quincenales variaron según los orígenes de *Pinus pinaster*. En la segunda quincena destacan las procedencias de Sierra Bermeja y Sierras de Segura-Alcaraz, con un crecimiento quincenal espectacular próximo a los 50 mm (tabla 27), mientras que el resto de los orígenes tienen incrementos de crecimiento entre 13 y 30 mm. En la tercera quincena destaca el crecimiento de femia llegando casi a los 30 mm, estancándose el resto de las procedencias entre 5 y 20 mm. Destaca también en esta quincena la caída de

crecimiento en las procedencias de Sierra Bermeja y Segura-Alcaraz. Esta caída ocurre en el "pino femia" y en Sierra de Oña 15 días después, relacionado con el retraso en la germinación de estos orígenes. Las otras tres procedencias no manifestaron cambios tan acusados en los incrementos de crecimiento manteniéndose en un rango de crecimiento entre 15 y 20 mm. En la quinta y sexta quincena se aprecia un crecimiento significativamente menor de Sierra Bermeja y Segura Alcaraz respecto al resto de las procedencias, que se mantienen con unos valores muy similares. A partir de la sexta quincena, momento en el que la planta se traslada al exterior, se aprecia en todas las procedencias una fuerte caída del crecimiento que se va acentuando gradualmente hasta la duodécima semana en la que el crecimiento en altura es nulo.

Analizando globalmente la evolución de los incrementos de crecimiento en todo el periodo de ensayo, se aprecia un comportamiento muy semejante en las procedencias de Sierra Bermeja y Segura-Alcaraz, con gráficas prácticamente paralelas (Fig. 44). Las otras procedencias no se comportan de una forma similar entre sí, principalmente en las cuatro primeras quincenas, pero en el resto del ensayo los incrementos de crecimiento sí evolucionan de una manera muy parecida.

Tabla 27.- Influencia de las procedencias sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros. Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: PROC.- procedencias; SB.- Sierra Bermeja; SC.- Serranía de Cuenca; F.- "pino femia", Noroeste; SG.- Sierra de Gredos; MC.- Meseta Castellana; SO.- Sierra de Oña; SSA.- Sierras de Segura-Alcaraz; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

	QUINCENAS										
PROC.	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
SB	43,36 a	8,17 d	20,54 a	25,80 c	24,65 b	8,13 c	2,43 c	1,47 c	0,51 bc	0,26 bc	0,00 a
SC	30,29 b	15,32 c	16,36 b	29,30 ab	29,98 a	11,08 b	3,44 ab	2,05 ab	0,66 bc	0,33 bc	0,00 a
F	13,67 d	27,90 a	8,54 d	29,76 ab	32,33 a	12,88 a	3,69 a	2,45 a	1,22 a	0,61 a	0,00 a
SG	23,28 c	18,68 bc	15,06 b	31,38 a	30,60 a	10,37 b	2,91 abc	1,95 abc	0,98 ab	0,49 ab	0,00 a
MC	27,36 bc	19,65 b	15,17 b	29,97 ab	31,12 a	11,95 ab	2,73 bc	1,74 bc	0,78 abc	0,39 abc	0,00 a
SO	17,57 d	19,89 b	11,86 c	28,91 b	31,73 a	10,43 b	2,47 c	1,43 c	0,42 c	0,21 c	0,00 a
SSA	47,56 a	4,92 d	20,26 a	26,04 c	24,17 b	10,87 b	3,60 ab	2,13 ab	0,67 bc	0,34 bc	0,00 a
DMS	4,26	3,76	2,98	2,20	2,39	1,69	0,84	0,51	0,43	0,21	0,00

4.3.2.2. Crecimiento por inóculos

Atendiendo al tipo de inóculo utilizado (tabla 28), no se detectan diferencias significativas en los incrementos de crecimiento entre la tercera y sexta quincena (periodo de cultivo bajo abrigo). Sin embargo, en el resto del periodo de ensayo, tanto en la segunda quincena como a partir de la séptima, momento en el que la planta ya se encuentra en el exterior, se aprecia un crecimiento significativamente superior de los tratamientos inoculados con *Pisolithus tinctorius*, mientras que los tratamientos control y los que fueron inoculados con

Paxillus involutus se mantienen con un comportamiento análogo, aunque con cierta tendencia a crecimientos mayores por parte de este último (quincenas 8 y 9).

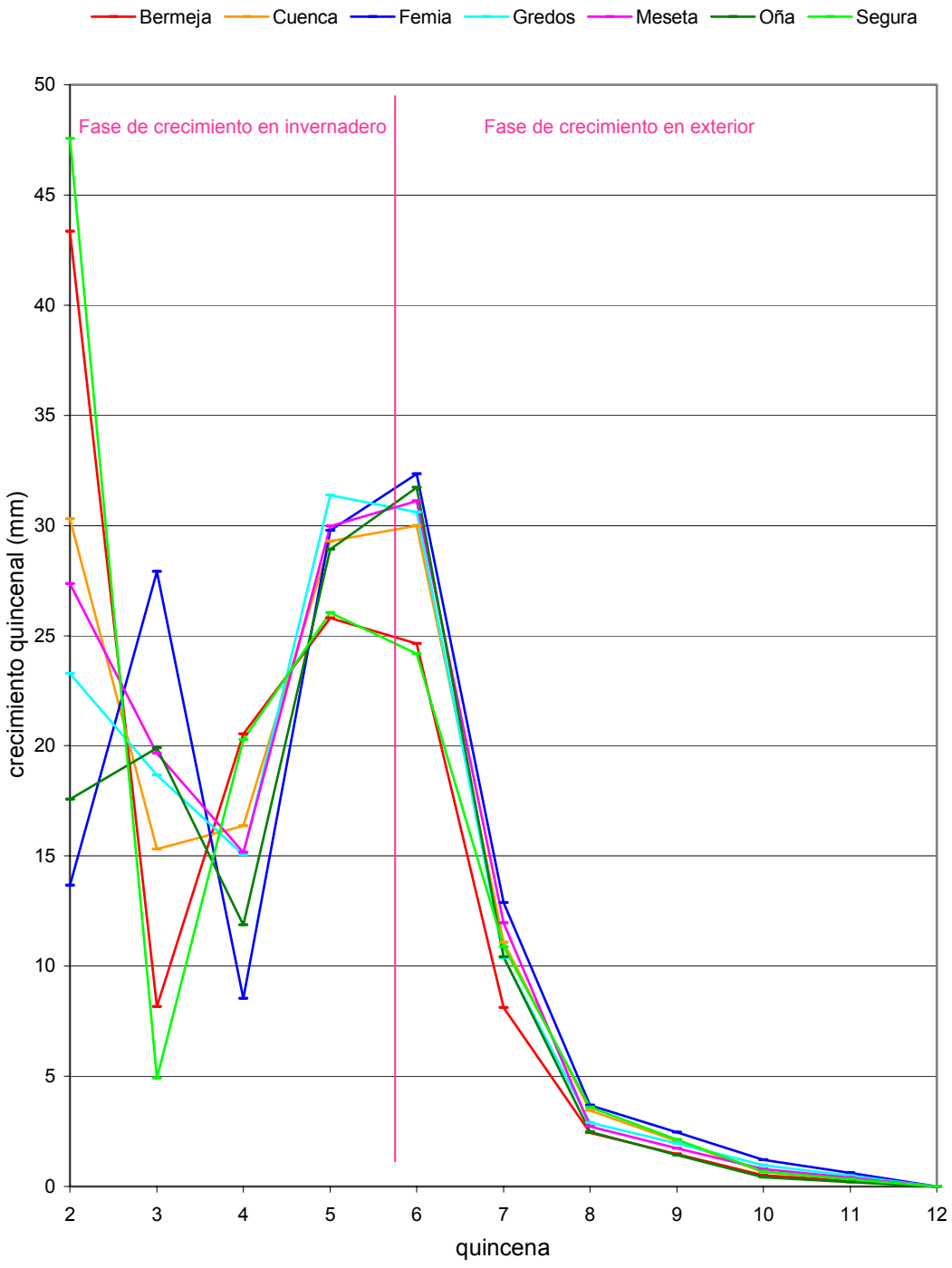


Fig. 44.- Crecimientos quincenales de los 7 orígenes de *Pinus pinaster* Ait. ensayados durante todo el periodo de ensayo.

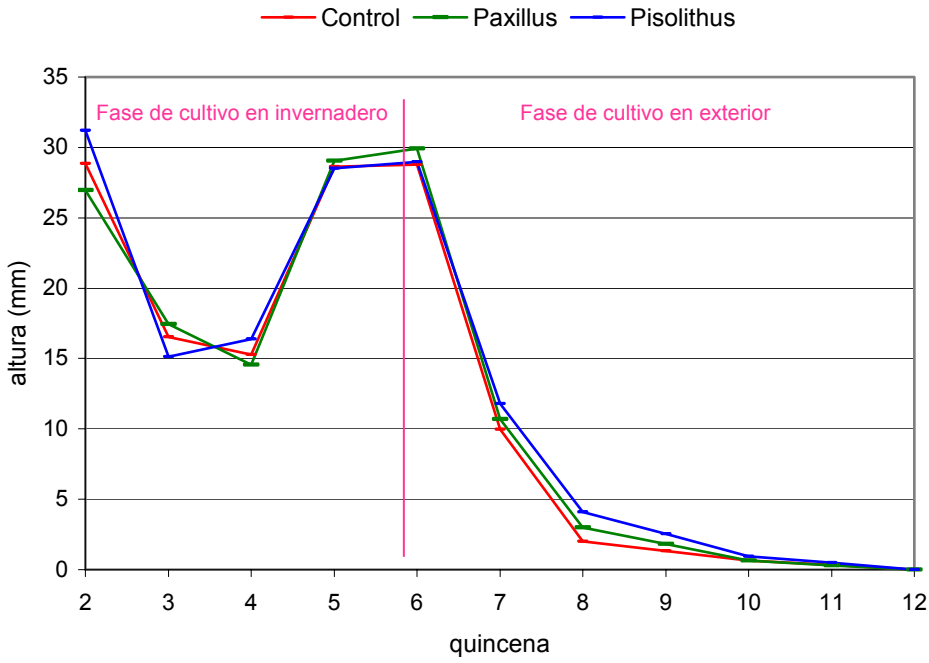


Fig. 45.- *Pinus pinaster* Ait. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 28.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros. Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

	Q U I N C E N A S										
INÓC.	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	28,85 ab	16,53 a	15,29 a	28,65 a	28,79 a	9,98 b	2,02 c	1,32 c	0,65 b	0,33 b	0,00 a
Pi	26,98 b	17,44 a	14,55 a	29,03 a	29,92 a	10,68 ab	2,99 b	1,81 b	0,64 b	0,32 b	0,00 a
Pt	31,21 a	15,11 a	16,36 a	28,52 a	28,97 a	11,78 a	4,10 a	2,53 a	0,96 a	0,48 a	0,00 a
DMS	2,79	2,46	1,95	1,44	1,56	1,11	0,55	0,33	0,28	0,14	0,00

4.3.2.3. Crecimiento de la región de procedencia Sierra Bermeja

En la figura 46 se puede apreciar la evolución de las plantas de *Pinus pinaster* de la región de procedencia Sierra Bermeja en cada quincena y en la tabla 29 la comparación de medias mediante el test de Duncan.

En la fase de cultivo en invernadero (hasta la sexta quincena) se observa un crecimiento significativamente superior del tratamiento inoculado con *Paxillus* frente al de *Pisolithus* y el

control en todas las fechas excepto en la segunda quincena en la que el de *Pisolithus* es significativamente mayor.

En la etapa de crecimiento en exterior, sólo se detectan diferencias significativas entre tratamientos en la octava y novena quincena en las que el inoculado con *Pisolithus tinctorius* tuvo crecimientos significativamente superiores al de *Paxillus* y al control.

Foto 55.- Detalle de las plantas 45 días después de la siembra. Sierra Bermeja (izq.) y Sierra de Oña (dcha.)

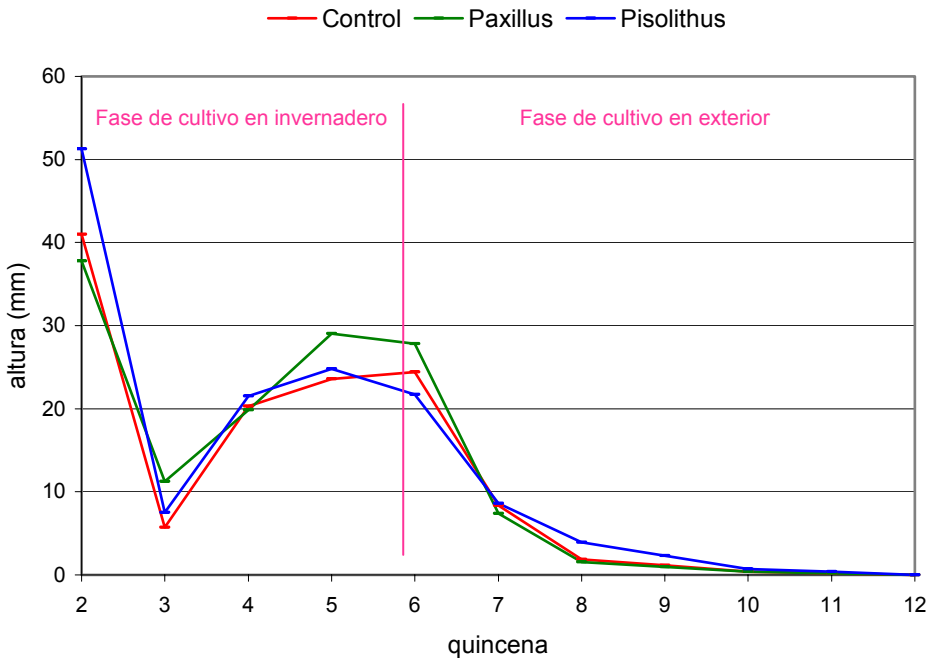


Fig. 46.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Sierra Bermeja. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 29.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Sierra Bermeja, cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	41,00 b	5,71 b	20,29 a	23,58 b	24,42 ab	8,35 a	1,88 b	1,15 b	0,42 a	0,21 a	0,00 a
Pi	37,79 b	11,25 a	19,83 a	29,01 a	27,82 a	7,40 a	1,51 b	0,95 b	0,40 a	0,20 a	0,00 a
Pt	51,29 a	7,54 b	21,50 a	24,79 b	21,71 b	8,63 a	3,91 a	2,32 a	0,73 a	0,36 a	0,00 a
DMS	8,02	3,52	4,23	4,13	4,52	2,53	1,26	0,80	0,66	0,33	0,00

4.3.2.4. Crecimiento de la región de procedencia Serranía de Cuenca

En la tabla 30 se encuentran los resultados de comparación de medias para el test de Duncan mientras que en la figura 47 se puede apreciar visualmente la variación de crecimientos quincenales durante todo el periodo de ensayo.

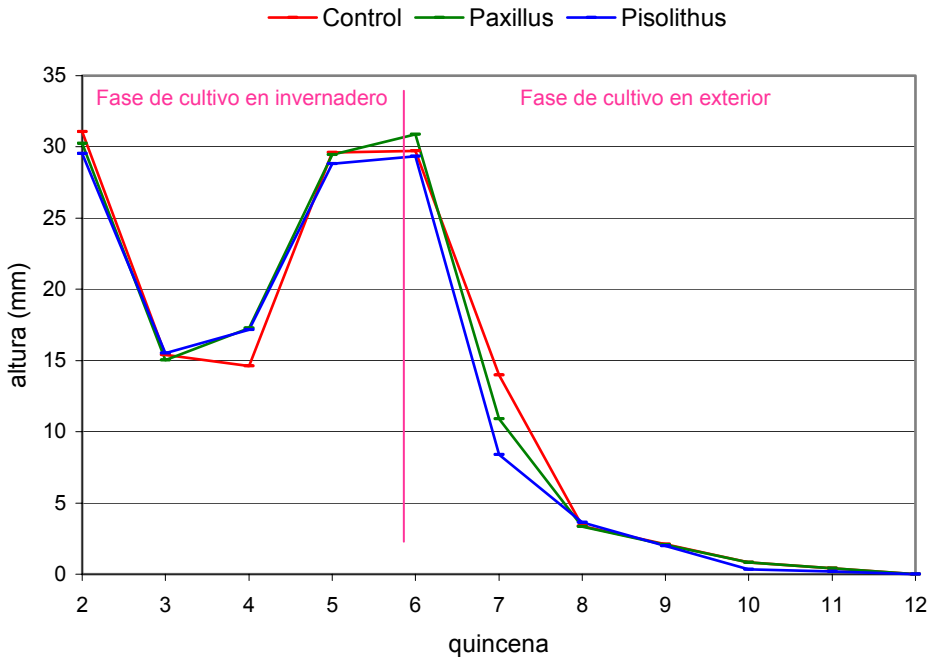


Fig. 47.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Serranía de Cuenca. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Solamente se observan diferencias significativas en una quincena de todas las fechas de muestreo. Durante el periodo de cultivo en invernadero, el crecimiento de los tres tratamientos fue similar. La única quincena en la que se detectan diferencias significativas es la séptima, el

primer muestreo realizado después de trasladarse la planta al exterior, en la que el tratamiento control tuvo un crecimiento significativamente superior al de los tratamientos inoculados.

Tabla 30.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Serranía de Cuenca, cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	31,08 a	15,42 a	14,63 a	29,60 a	29,73 a	13,96 a	3,39 a	2,10 a	0,81 a	0,41 a	0,00 a
Pi	30,25 a	15,04 a	17,29 a	29,45 a	30,88 a	10,90 b	3,32 a	2,07 a	0,81 a	0,41 a	0,00 a
Pt	29,54 a	15,50 a	17,17 a	28,83 a	29,33 a	8,39 b	3,63 a	1,99 a	0,35 a	0,18 a	0,00 a
DMS	9,10	8,27	6,47	4,08	4,75	2,81	1,66	0,93	0,74	0,37	0,00

4.3.2.5. Crecimiento de la región de procedencia Noroeste, "pino femia"

La evolución de los incrementos de crecimiento de las plantas de "pino femia" en cada quincena se refleja en la figura 48 y los resultados de la comparación de medias (test de Duncan) se muestran en la tabla 31.

Solamente se han detectado diferencias significativas en tres quincenas de todas las fechas muestreadas.

Durante la etapa de crecimiento en invernadero se observa que en la segunda quincena hay un crecimiento superior por parte de las plantas control seguidas de las inoculadas con *Paxillus*, mientras que las plantas inoculadas con *Pisolithus* fueron las que tuvieron un menor desarrollo. Los crecimientos posteriores son similares hasta la quincena sexta en la que el tratamiento con un crecimiento superior es el de *Paxillus involutus*.

Una vez que las plantas están en el exterior no se observan diferencias significativas entre tratamientos excepto en la quincena 8, en la que el mayor crecimiento corresponde al tratamiento inoculado con *Pisolithus tinctorius* seguido del de *Paxillus involutus* y del control.

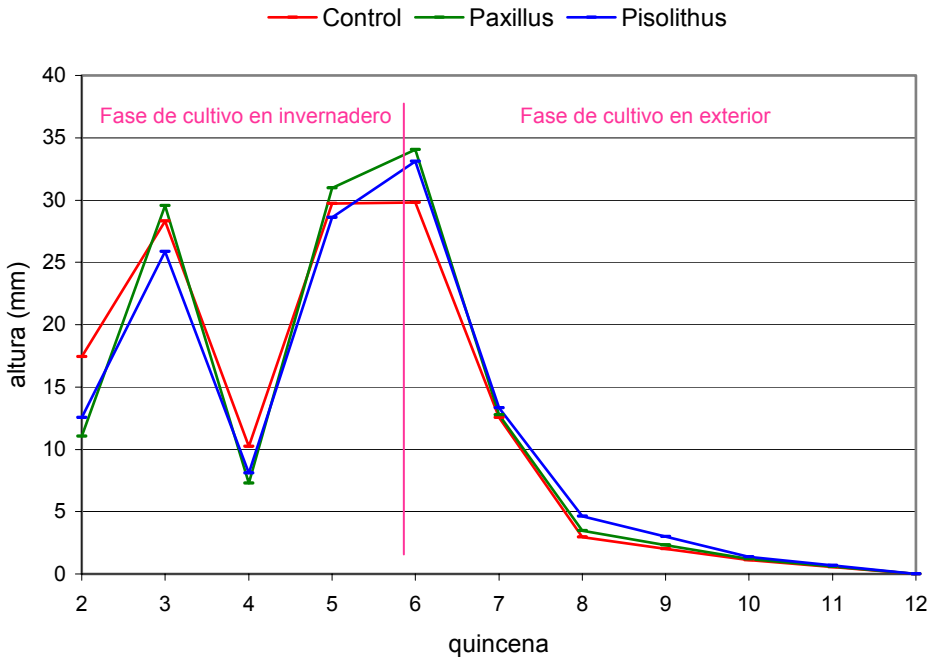


Fig. 48.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Noroeste (pino "femia"). Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 31.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Noroeste "pino femia", cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	17,42 a	28,29 a	10,25 a	29,72 a	29,82 b	12,53 a	2,97 b	2,03 a	1,10 a	0,55 a	0,00 a
Pi	11,04 b	29,54 a	7,29 a	30,94 a	34,06 a	12,78 a	3,48 ab	2,33 a	1,19 a	0,59 a	0,00 a
Pt	12,54 ab	25,88 a	8,08 a	28,63 a	33,13 ab	13,32 a	4,62 a	2,99 a	1,35 a	0,68 a	0,00 a
DMS	5,23	6,43	5,21	4,27	3,84	3,48	1,54	0,99	0,88	0,44	0,00

4.3.2.6. Crecimiento de la región de procedencia Sierra de Gredos

La comparación de las medias de los crecimientos quincenales en cada fecha (test de Duncan), para las plantas de la región de procedencia Sierra de Gredos, se muestra en la tabla 32 y su representación gráfica en la figura 49.

Se han detectado diferencias significativas en 6 de las 11 fechas muestreadas. Se observa en general un crecimiento mayor por parte del tratamiento inoculado con *Pisolithus tinctorius* mientras que el inoculado con *Paxillus involutus* tiende a tener los menores crecimientos quincenales, principalmente en la fase de crecimiento bajo abrigo.

En la segunda y quinta quincena se observan crecimientos significativamente inferiores por parte del tratamiento inoculado con *Paxillus*, mientras que el tratamiento de *Pisolithus* y el control tienen crecimientos similares.

Ya en la etapa de crecimiento en exterior, en las quincenas 7, 9 y 11 se observa un crecimiento significativamente superior del tratamiento inoculado con *Pisolithus*. En la quincena 10, en cambio, se detecta un crecimiento significativo mayor por parte del control.

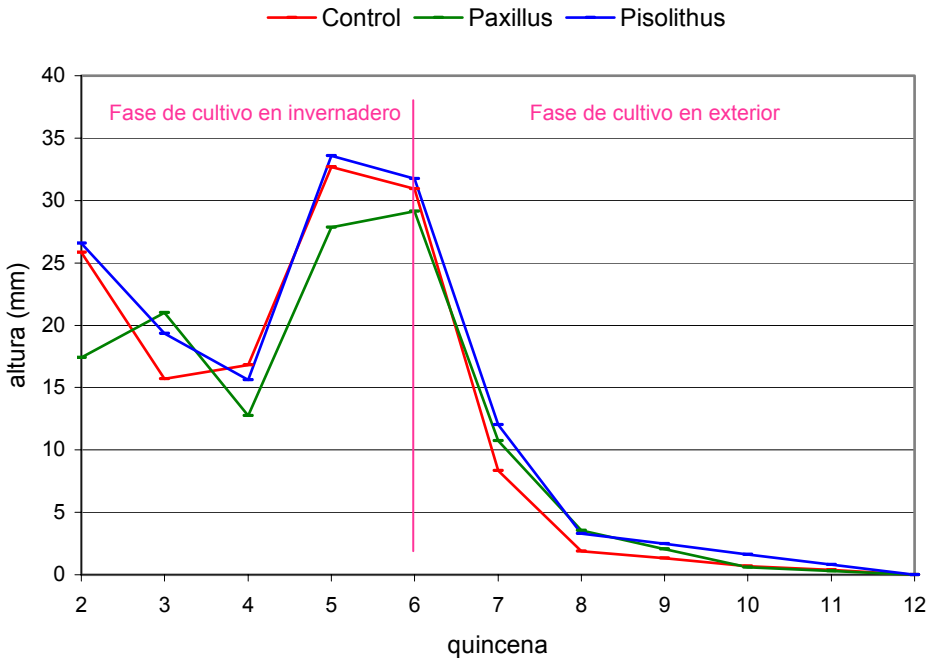


Fig. 49.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Sierra de Gredos. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 32.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Sierra de Gredos, cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	25,83 a	15,71 a	16,79 a	32,69 a	30,93 a	8,35 b	1,88 a	1,31 b	1,65 a	0,36 ab	0,00 a
Pi	17,42 b	21,00 a	12,75 a	27,83 b	29,13 a	10,74 ab	3,54 a	2,06 ab	0,71 b	0,29 b	0,00 a
Pt	26,58 a	19,33 a	15,63 a	33,60 a	31,74 a	12,01 a	3,31 a	2,50 a	0,58 b	0,82 a	0,00 a
DMS	8,26	7,30	5,65	2,99	3,84	2,79	1,69	1,05	0,94	0,47	0,00

4.3.2.7. Crecimiento de la región de procedencia Meseta Castellana

En la tabla 33 se muestra la comparación de medias, empleando el test de Duncan, para cada una de las fechas (quincenas) muestreadas.

Durante la etapa de crecimiento en invernadero no se han observado diferencias significativas en el crecimiento de los distintos tratamientos.

Una vez en el exterior, sólo se han detectado diferencias significativas en las quincenas 7, 8 y 9. En la séptima quincena el tratamiento de *Pisolithus* tiene un crecimiento significativamente superior al de *Paxillus* y al control, mientras que en la octava y novena quincena los tratamientos de *Paxillus* y *Pisolithus*, muestran un comportamiento similar y con un crecimiento significativamente superior al control.

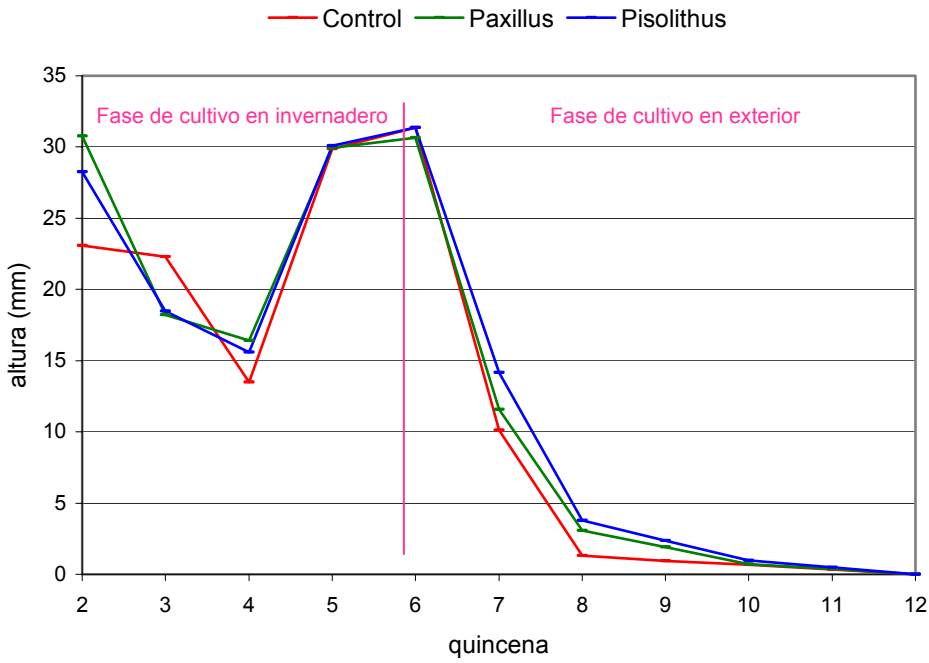


Fig. 50.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Meseta Castellana. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 33.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Meseta Castellana, cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	23,08 a	22,29 a	13,50 a	29,86 a	31,35 a	10,12 b	1,34 b	0,95 b	0,67 a	0,33 a	0,00 a
Pi	30,75 a	18,21 a	16,42 a	29,94 a	30,65 a	11,57 b	3,06 a	1,90 a	0,73 a	0,36 a	0,00 a
Pt	28,25 a	18,46 a	15,58 a	30,10 a	31,36 a	14,16 a	3,78 a	2,37 a	0,96 a	0,48 a	0,00 a
DMS	8,97	8,14	5,98	4,60	4,84	2,43	1,34	0,84	0,75	0,38	0,00

4.3.2.8. Crecimiento de la región de procedencia Sierra de Oña

Los resultados de la comparación de medias (test de Duncan) en cada fecha (quincena desde la siembra) se muestran en la tabla 34. Se observan diferencias significativas en 7 de las fechas de muestreo, siendo los tratamientos inoculados en general mejores que el control. Los crecimientos quincenales de las plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius* fueron significativamente superiores en las quincenas 4, 8, 9, 10 y 11. Solamente en la tercera quincena el crecimiento fue significativamente más bajo que las plantas inoculadas con *Paxillus involutus* observándose un crecimiento intermedio en la séptima quincena.

Durante el periodo de cultivo en invernadero (quincenas 2 a 6), cuando los crecimientos fueron mayores, hubo diferencias significativas entre tratamientos en la tercera y cuarta quincena. En la tercera quincena el tratamiento de *Pisolithus* fue significativamente inferior al de *Paxillus*, manteniéndose en valores intermedios el control, en cambio, en la cuarta quincena el tratamiento de *Paxillus* y el control fueron significativamente inferiores al de *Pisolithus*. En el resto de las quincenas durante el cultivo de invernadero todos los tratamientos tuvieron valores similares.

En la fase de exterior, a partir de la quincena 6, se produce una reducción de crecimiento paulatina en todos los tratamientos, con diferencias significativas entre ellos en todas las fechas, hasta que cesa el crecimiento en altura en la quincena 12. El tratamiento que experimenta un crecimiento mayor en todas las quincenas es el inoculado con *Pisolithus tinctorius*.

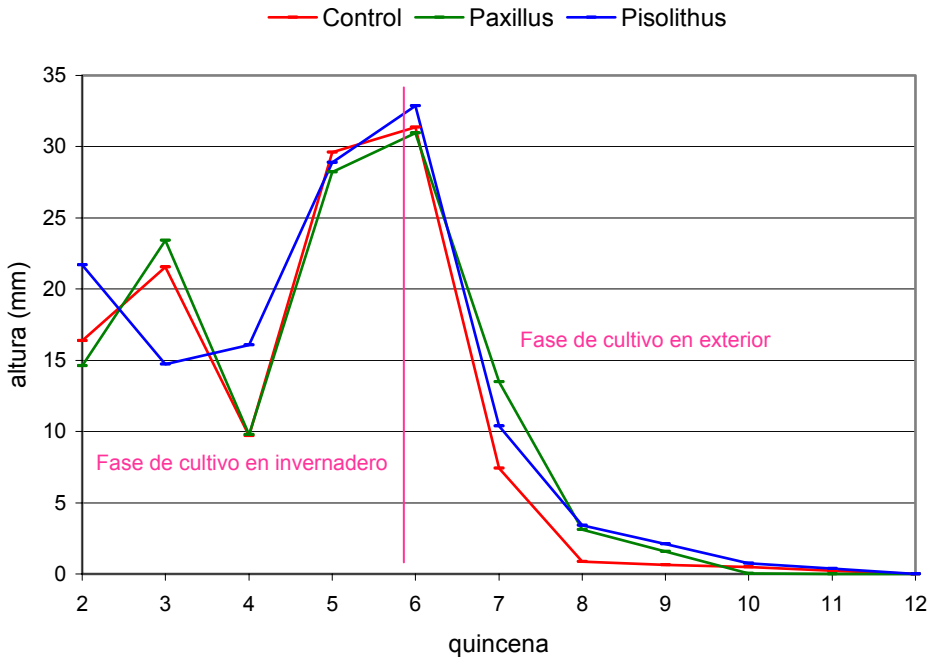


Fig. 51.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Sierra de Oña. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 34.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Sierra de Oña, cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	16.38 a	21.54 ab	9.71 b	29.60 a	31.36 a	7.42 b	0.89 b	0.65 b	0.48 ab	0.24 ab	0.00 a
Pi	14.63 a	23.42 a	9.79 b	28.22 a	30.95 a	13.48 a	3.12 a	1.57 a	0.02 b	0.01 b	0.00 a
Pt	21.71 a	14.71 b	16.08 a	28.91 a	32.88 a	10.38 ab	3.41 a	2.08 a	0.75 a	0.38 a	0.00 a
DMS	6.97	7.51	4.76	3.83	3.93	3.46	1.48	0.85	0.61	0.31	0.00

4.3.2.9. Crecimiento de la región de procedencia Segura-Alcaraz

En la tabla 35 se pueden ver los resultados de la comparación de medias de los crecimientos quincenales (test de Duncan).

En la etapa de cultivo en invernadero, se observan diferencias significativas en la tercera y en la quinta semana. Los crecimientos fueron más altos para el control en la tercera quincena y para *Paxillus* en la quinta.

En la fase de exterior, se observan diferencias significativas en las tres primeras quincenas, 7, 8 y 9, y siempre con un mejor comportamiento por parte del tratamiento inoculado con *Pisolithus tinctorius*, que tiene un crecimiento significativamente superior al de *Paxillus* y al control.

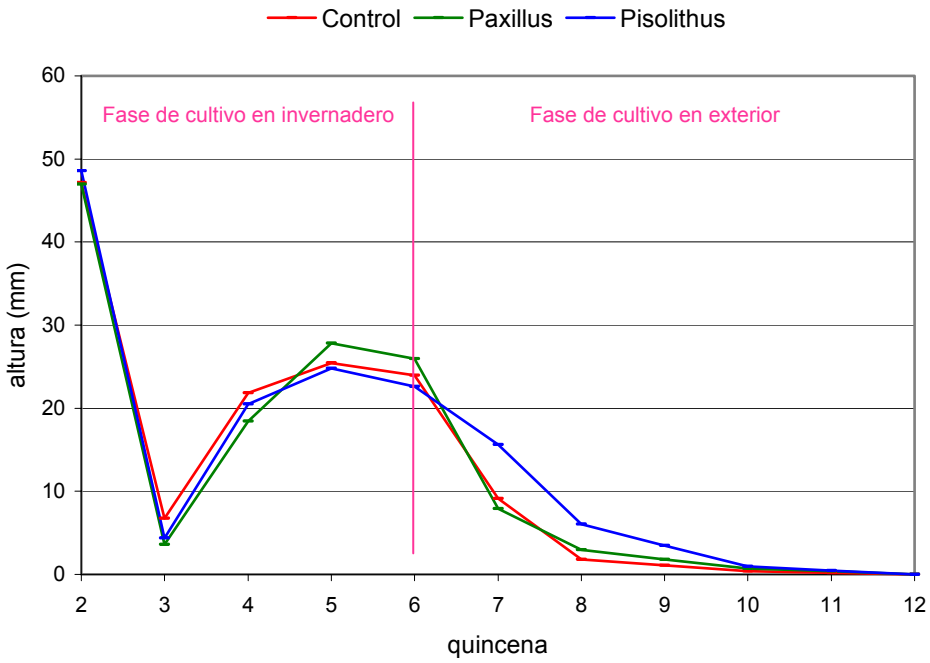


Fig. 52.- *Pinus pinaster* Ait. Región de procedencia: Segura-Alcaraz. Crecimientos quincenales de plantas inoculadas con inóculo miceliar de *Paxillus involutus,* esporas de *Pisolithus tinctorius* y control (media de 12 plantas).

Tabla 35.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* Ait., región de procedencia Segura-Alcaraz, cultivadas en contenedor. Valores del incremento de altura quincenal de las plántulas en milímetros (media de 12 plantas). Las fechas (Q.nº) son las quincenas transcurridas desde la siembra. Abreviaturas: c.- control; Pi.- *Paxillus involutus*; Pt.- *Pisolithus tinctorius*; DMS.- diferencia mínima significativa. Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INOC.	Q U I N C E N A S										
	Q.2	Q.3	Q.4	Q.5	Q.6	Q.7	Q.8	Q.9	Q.10	Q.11	Q.12
c	47,13 a	6,75 a	21,83 a	25,47 ab	23,95 a	9,15 b	1,82 b	1,09 b	0,35 a	0,18 a	0,00 a
Pi	46,96 a	3,63 b	18,46 a	27,84 a	25,95 a	7,88 b	2,93 b	1,82 b	0,73 a	0,36 a	0,00 a
Pt	48,58 a	4,38 ab	20,50 a	24,80 b	22,62 a	15,59 a	6,05 a	3,49 a	0,94 a	0,47 a	0,00 a
DMS	4,49	2,85	3,93	2,89	3,49	3,15	1,36	0,80	0,62	0,31	0,00

4.3.3. Estado sanitario

Periódicamente se recogían y se analizaban todas aquellas plántulas que tenían síntomas de plaga o enfermedad. El porcentaje final de marras fue del 1,02%. El agente causal y su porcentaje de presencia frente al total de plantas dañadas fueron los siguientes:

Nemátodos	4,9 %
Fusarium spp.	31,7 %
Bacterias	19,5 %
Monilochaetes	12,2 %
Cephalosporium	7,3 %
Desconocido	24,4 %

No se apreció relación alguna entre el número de plantas enfermas o el agente causal y el estado de micorrización o la procedencia de la semilla.

4.3.4. Evaluación de la micorrización y del crecimiento al final del ensayo

A continuación se detallan los datos finales de crecimiento y de micorrización para los diferentes orígenes (procedencias) evaluados una vez finalizado el ensayo.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre procedencias en todas las variables biométricas determinadas, sin embargo no hubo diferencias significativas entre inóculos en las variables de longitud, peso seco raíz y peso seco total.

En todos los casos se detectó también una interacción significativa de inóculo x origen excepto en la relación longitud de la parte aérea / peso seco parte aérea.

En cuanto a la micorrización se observaron diferencias significativas entre inóculos y entre orígenes e interacción inóculo x origen en los porcentajes totales de micorrización y en el morfotipo F1. En los morfotipos F5 y FN no hubo diferencias significativas en ningún caso (inóculo, origen e inóculo x origen).

4.3.5. Análisis de los resultados por procedencias

Los resultados de las variables biométricas así como los de micorrización para cada procedencia y tratamiento de inoculación se indican en la tabla 36.

4.3.5.1. Región de procedencia Sierra Bermeja

Se han detectado diferencias significativas entre tratamientos en todas las variables biométricas determinadas. Los tratamientos inoculados con *Paxillus involutus* y *Pisolithus*

Tabla 36.- Influencia del inóculo sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster*, en función del origen de la semilla. LONG.- longitud de la parte aérea; PS-PA.- peso seco de la parte aérea; PS-R.- peso seco de las raíces; PS-P.- peso seco de la planta (PS-PA + PS-R); R-PS.- relación del peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz (PS-PA/PS-R); R-PA.- relación de la longitud (dm) y el peso seco de la parte aérea (g) (L-PA/PS-PA); MIC.- porcentaje de micorrización total (transformación arcsen); MIC-F1.- porcentaje del morfotipo F1 (transformación arcsen); MIC-F5.- porcentaje del morfotipo F5 (transformación arcsen); MIC-FN.- porcentaje del morfotipo FN (transformación arcsen);DMS.- diferencia mínima significativa.

Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

		INÓCULO	PS-PA (g)	LONG (mm)	PS-R (g)	PS-P (g)	R-PS	R-PA	MIC	MIC-F1	MIC-F5	MIC-FN
PROCEDENCIAS	BERMEJA	control	0,965 b	128,300 b	0,381 c	1,346 b	2,667 a	1,385 a	33,055 a	32,976 a	0,387 a	0,000 a
		Paxillus	1,298 a	143,950 a	0,589 a	1,887 a	2,176 b	1,175 b	36,090 a	35,951 a	0,831 a	0,000 a
		Pisolithus	1,285 a	142,600 a	0,513 b	1,798 a	2,499 ba	1,174 b	36,067 a	34,956 a	3,053 a	0,000 a
		DMS	0,213	13,120	0,072	0,275	0,375	0,166	8,924	8,999	2,867	0,000
	CUENCA	Control	1,130 a	139,950 a	0,489 a	1,492 a	2,111 a	1,582 a	32,164 a	32,164 a	0,000 a	0,000 a
		Paxillus	1,152 a	145,350 a	0,526 a	1,656 a	2,122 a	1,396 a	39,277 a	38,685 a	0,000 a	0,000 a
		Pisolithus	1,003 a	131,900 a	0,482 a	1,634 a	2,386 a	1,245 a	35,305 a	35,124 a	0,947 a	0,000 a
		DMS	0,223	18,240	0,076	0,278	0,374	0,337	9,433	9,570	1,126	0,000
	FEMIA	control	0,875 a	128,700 a	0,331 a	1,206 a	2,884 a	1,601 ab	28,229 a	28,019 a	0,741 a	0,000 a
		Paxillus	0,826 a	135,900 a	0,351 a	1,177 a	2,367 b	1,919 a	35,264 a	35,100 a	0,508 a	0,000 a
		Pisolithus	1,029 a	132,300 a	0,338 a	1,366 a	3,187 a	1,373 b	25,729 a	25,611 a	0,442 a	0,000 a
		DMS	0,205	10,450	0,086	0,268	0,494	0,352	9,115	9,150	1,637	0,000
	GREDOS	control	0,912 a	134,950 ba	0,432 a	1,343 a	2,168 a	1,641 a	28,391 a	28,331 a	0,407 a	0,000 a
		Paxillus	0,858 a	131,500 b	0,442 a	1,299 a	1,933 a	1,687 a	33,640 a	33,308 a	0,767 a	0,000 a
		Pisolithus	0,921 a	145,700 a	0,487 a	1,408 a	1,880 a	1,725 a	24,396 a	24,396 a	0,000 a	0,000 a
		DMS	0,199	12,260	0,081	0,266	0,327	0,318	10,570	10,630	1,419	0,000
	MESETA	Control	0,966 a	157,350 a	0,475 a	1,440 a	2,042 b	1,727 a	22,798 a	22,798 a	0,000 a	0,000 a
		Paxillus	0,875 a	140,850 b	0,439 a	1,313 a	2,041 b	1,765 a	29,251 a	28,540 a	1,249 a	0,000 a
		Pisolithus	0,917 a	139,000 b	0,394 a	1,311 a	2,651 a	1,568 a	23,712 a	23,318 a	1,105 a	0,000 a
		DMS	0,162	11,090	0,087	0,227	0,443	0,271	9,650	9,850	2,009	0,000
	OÑA	Control	0,883 a	134,300 a	0,447 a	1,330 a	1,880 ba	2,077 a	29,764 a	29,653 a	0,644 a	0,000 a
		Paxillus	0,863 a	129,500 a	0,492 a	1,355 a	1,786 b	1,605 a	27,570 a	27,570 a	0,000 a	1,328 a
		Pisolithus	0,885 a	127,950 a	0,418 a	1,303 a	2,162 a	1,583 a	25,531 a	25,531 a	0,000 a	0,000 a
		DMS	0,215	12,700	0,093	0,294	0,316	0,749	8,249	8,263	0,745	2,172
	SEGURA	Control	1,399 ba	143,750 ba	0,495 a	1,894 ba	2,847 ba	1,089 a	30,030 c	30,030 c	0,000 b	0,000 a
		Paxillus	1,201 b	136,200 b	0,466 a	1,666 b	2,576 b	1,347 a	53,883 a	53,883 a	0,000 b	0,000 a
		Pisolithus	1,491 a	148,500 a	0,499 a	1,990 a	3,093 a	1,069 a	40,135 b	39,970 b	1,115 a	0,000 a
		DMS	0,231	9,530	0,076	0,285	0,402	0,417	8,849	8,847	1,003	0,000

tinctorius fueron similares entre sí y significativamente superiores al tratamiento control en las variables peso seco parte aérea, longitud parte aérea y peso seco total. En la variable peso seco raíz hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos, correspondiendo el valor más elevado al tratamiento inoculado con *Paxillus* seguido de *Pisolithus* y, por último, del control (0,589 g, 0,513 g y 0,381 g respectivamente).

En cuanto a las relaciones peso seco parte aérea / peso seco raíz y longitud parte aérea / peso seco parte aérea, los valores son significativamente más bajos en *Paxillus* y *Pisolithus* que en el control, indicando un mayor desarrollo del sistema radicular respecto a la parte aérea y un mayor volumen de la parte aérea en relación con su altura en los tratamientos inoculados.

No se observaron, sin embargo, diferencias entre inóculos en los porcentajes de micorrización. Por tanto, el efecto positivo de los tratamientos de inoculación sobre el desarrollo de las plantas de Sierra Bermeja no se reflejó en el porcentaje de micorrización, que fue similar en todos los tratamientos.

4.3.5.2. Región de procedencia Serranía de Cuenca

No se han manifestado diferencias entre los distintos tratamientos para ninguna variable analizada entre las plantas de la región de procedencia Serranía de Cuenca.

4.3.5.3. Región de procedencia Noroeste, "pino femia"

Las plantas procedentes de la región Noroeste, sólo han manifestado diferencias significativas en las variables relación peso seco parte aérea / peso seco raíz y relación longitud parte aérea / peso seco parte aérea. El resto de las variables tanto las biométricas como las de micorrización han tenido valores similares en los tres tratamientos de inoculación.

En la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz el tratamiento que obtuvo el valor significativamente inferior fue el inoculado con *Paxillus* (2,367) mientras que el de *Pisolithus* y el control tuvieron valores semejantes (3,187 y 2,884 respectivamente). En cambio, en la relación longitud parte aérea / peso seco parte aérea fue el de *Pisolithus* el que alcanzó el valor significativamente menor (1,373) mientras que el mayor correspondió a *Paxillus* (1,919), situándose el tratamiento control con un valor intermedio (1,601). Esto indica que las plantas inoculadas con *Paxillus involutus* tuvieron un desarrollo radicular en relación con el volumen de la parte aérea mayor que el resto de los tratamientos a la vez que su parte aérea

se desarrollaba más en longitud que en volumen. Las plantas inoculadas con *Pisolithus*, en cambio, se comportaron de forma contraria.

4.3.5.4. Región de procedencia Sierra de Gredos

Las plantas procedentes de Sierra de Gredos no manifestaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en ninguna variable estudiada excepto en la altura de la parte aérea. En esta última, el tratamiento inoculado con *Pisolithus tinctorius* fue el que mayor altura alcanzó (145,700 mm), seguida del tratamiento control, mientras que el tratamiento con *Paxillus involutus* experimentó el crecimiento menor (131,500 mm) y significativamente diferente al de *Pisolithus*.

4.3.5.5. Región de procedencia Meseta Castellana

La región de procedencia Meseta Castellana únicamente experimentó diferencias significativas en cuanto a la longitud de su parte aérea y la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz. El resto de las variables no manifestaron diferencias.

En cuanto a la longitud, al contrario que el resto de los orígenes (procedencias), el tratamiento control fue el que mayor crecimiento alcanzó (157,350 mm), separándose significativamente de los dos tratamientos inoculados.

En la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz, fueron las plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius* las que alcanzaron los valores significativamente superiores (2,651), mientras que las de *Paxillus involutus* y los controles, con valores semejantes, alcanzaron los más pequeños (2,041 y 2,042 respectivamente).

4.3.5.6. Región de procedencia Sierra de Oña

La región de procedencia Sierra de Oña también ofreció pocas diferencias significativas. Sólo se observaron en la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz. En este caso fue el tratamiento con *Paxillus* el que tuvo el menor valor (1,786), seguido del control (1,880) y, por último, el de *Pisolithus* (2,162), con un valor significativamente mayor.

4.3.5.7. Región de procedencia Sierras de Segura-Alcaraz

Las plantas de la región de procedencia Segura-Alcaraz, junto con las de Sierra Bermeja, son las que manifestaron un mayor número de variables con diferencias significativas entre los distintos tratamientos de inoculación, y fue la única procedencia de

todas las ensayadas en las que se apreciaron diferencias significativas en el porcentaje de micorrización.

Las variables peso seco raíz y relación longitud parte aérea / peso seco parte aérea fueron las únicas que no mostraron diferencias entre tratamientos.

Las variables biométricas peso seco parte aérea, longitud parte aérea, peso seco total y relación peso seco parte aérea / peso seco raíz se comportaron de una forma similar. En todos los casos el tratamiento de *Pisolithus* fue significativamente superior al de *Paxillus*, y el control adoptó valores intermedios. Se observa que la inoculación con *Pisolithus* benefició principalmente a la parte aérea, incrementando, respecto al resto de los tratamientos, las variables biométricas indicadoras del volumen de la parte aérea (peso seco parte aérea, longitud parte aérea, peso seco total y relación peso seco parte aérea / peso seco raíz), mientras que el sitema radicular no manifestó diferencias.

En cuanto al porcentaje de micorrización, como ya se adelantó, fue la única procedencia (origen) que ofreció diferencias significativas. Las variables porcentaje de micorrización total y porcentaje del morfotipo F1, se comportaron de la misma forma: el tratamiento con *Paxillus* tuvo el mayor porcentaje de micorrización (53,883), seguido del de *Pisolithus* y por último el tratamiento control (30,030), con diferencias significativas entre los tres. En cuanto al porcentaje del morfotipo F5, fueron las plantas inoculadas con *Pisolithus* las que alcanzaron el valor significativamente superior (1,115), mientras que tanto en *Paxillus* como en el control no se detectó ningún morfotipo F5 tomando, por tanto, el valor de 0.

4.3.6. Análisis de los resultados por inóculos

Los resultados de las variables biométricas y los de micorrización para cada tratamiento de inoculación y procedencia (origen) de la semilla se indican en la tabla 37.

4.3.6.1. Controles sin inocular

Segura-Alcaraz fue el origen que alcanzó el mayor peso seco de la parte aérea (1,399 g), mientras que el resto de los orígenes tuvieron valores similares entre sí (entre 0,875 g y 1,003 g) y significativamente inferiores al de Segura-Alcaraz.

La variable longitud no ofreció los mismos resultados que el peso seco de la parte aérea lo que denota la existencia de morfologías diferentes de la parte aérea entre procedencias. Meseta Castellana fue la que alcanzó las mayores alturas de planta (157,350 mm), significativamente por encima de todas las demás, seguida de Segura-Alcaraz (143,750

Tabla 37.- Influencia del origen de las semillas sobre el crecimiento de plantas de *Pinus pinaster*, en función del inóculo utilizado. LONG.- longitud de la parte aérea; PS-PA.- peso seco de la parte aérea; PS-R.- peso seco de las raíces; PS-P.- peso seco de la planta (PS-PA + PS-R); R-PS.- relación del peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz (PS-PA/PS-R); R-PA.- relación de la longitud (dm) y el peso seco de la parte aérea (g) (L-PA/PS-PA); MIC.- porcentaje de micorrización total (transformación arcsen); MIC-F1.- porcentaje del morfotipo F1 (transformación arcsen); MIC-F5.- porcentaje del morfotipo F5 (transformación arcsen); MIC-FN.- porcentaje del morfotipo FN (transformación arcsen);DMS.- diferencia mínima significativa.

Nota: letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para el test de Duncan (P<0,05). "a" representa el valor más alto.

INÓCULO		PROCEDENCIAS	PS-PA (g)	LONG (mm)	PS-R (g)	PS-P (g)	R-PS	R-PA	MIC	MIC-F1	MIC-F5	MIC-FN
	CONTROL	Sierra Bermeja	0,965 b	128,300 c	0,381 bc	1,346 b	2,667 a	1,386 bc	33,055 a	32,976 a	0,388 a	0,000 a
		Serranía de Cuenca	1,003 b	139,950 bc	0,489 a	1,492 b	2,111 b	1,582 abc	32,164 ab	32,164 ab	0,000 a	0,000 a
		Noroeste, femia	0,875 b	128,700 c	0,331 c	1,206 b	2,884 a	1,601 abc	28,229 ab	28,019 ab	0,741 a	0,000 a
		Sierra de Gredos	0,912 b	134,950 bc	0,432 ab	1,343 b	2,168 b	1,641 abc	28,391 ab	28,331 ab	0,407 a	0,000 a
		Meseta Castellana	0,966 b	157,350 a	0,475 a	1,440 b	2,042 b	1,727 ab	22,798 b	22,798 b	0,000 a	0,000 a
		Sierra de Oña	0,883 b	134,300 bc	0,447 ab	1,330 b	1,880 b	2,077 a	29,764 ab	29,653 ab	0,644 a	0,000 a
		Segura-Alcaraz	1,399 a	143,750 b	0,495 a	1,894 a	2,847 a	1,089 c	30,030 ab	30,030 ab	0,000 a	0,000 a
		DMS	0,207	11,460	0,079	0,263	0,435	0,524	8,426	8,419	1,095	0,000
	PAXILLUS	Sierra Bermeja	1,298 a	143,950 ab	0,589 a	1,887 a	2,176 bc	1,175 c	36,090 bc	35,951 b	0,831 a	0,000 a
		Serranía de Cuenca	1,130 a	145,350 a	0,526 ab	1,656 a	2,122 bc	1,396 bc	39,277 b	38,685 b	0,000 a	0,000 a
		Noroeste, femia	0,826 b	135,900 abc	0,351 d	1,177 b	2,367 ab	1,919 a	35,264 bc	35,100 b	0,508 a	0,000 a
		Sierra de Gredos	0,858 b	131,500 bc	0,442 c	1,299 b	1,933 cd	1,687 ab	33,640 bc	33,308 b	0,767 a	0,000 a
		Meseta Castellana	0,875 b	140,850 abc	0,439 c	1,313 b	2,041 bcf	1,765 ab	29,251 bc	28,540 b	1,249 a	0,000 a
		Sierra de Oña	0,863 b	129,500 c	0,492 bc	1,355 b	1,786 d	1,605 ab	27,570 c	27,570 b	0,000 a	1,328 a
		Segura-Alcaraz	1,201 a	136,200 abc	0,466 bc	1,666 a	2,576 a	1,347 bc	53,883 a	53,883 a	0,000 a	0,000 a
		DMS	0,208	11,580	0,076	0,270	0,303	0,388	9,790	9,960	1,533	1,404
	PISOLITHUS	Sierra Bermeja	1,285 b	142,600 abc	0,513 a	1,798 ab	2,499 bc	1,174 cd	36,067 a	34,956 ab	3,053 a	0,000 a
		Serranía de Cuenca	1,152 bc	131,900 bc	0,482 ab	1,634 bc	2,386 bc	1,245 cd	35,305 a	35,124 ab	0,947 ab	0,000 a
		Noroeste, femia	1,029 cd	132,300 bc	0,338 c	1,366 cd	3,187 a	1,373 bc	25,729 b	25,611 bc	0,442 b	0,000 a
		Sierra de Gredos	0,921 d	145,700 ab	0,487 ab	1,408 cd	1,880 d	1,725 a	24,396 b	24,396 c	0,000 b	0,000 a
		Meseta Castellana	0,917 d	139,000 abc	0,394 bc	1,311 d	2,651 b	1,568 ab	23,712 b	23,318 c	1,105 ab	0,000 a
		Sierra de Oña	0,885 d	127,950 c	0,418 abc	1,303 d	2,162 cd	1,583 ab	25,531 b	25,531 bc	0,000 b	0,000 a
		Segura-Alcaraz	1,491 a	148,500 a	0,499 a	1,990 a	3,093 a	1,069 d	40,135 a	39,970 a	1,115 ab	0,000 a
		DMS	0,205	14,530	0,087	0,270	0,417	0,255	9,230	9,280	2,173	0,000

mm). La altura menor correspondió a Bermeja y "femia" (128,300 mm y 128,700 mm respectivamente). Cuenca, Gredos y Oña se situaron con valores intermedios (entre 134,300 y 139,950 mm).

Segura-Alcaraz, Meseta Castellana y Cuenca fueron los orígenes que desarrollaron el mayor volumen radicular (0,447 g – 0,495 g). Oña y Gredos tuvieron raíces de tamaño intermedio, seguidas de Sierra Bermeja y "femia", ésta última es la que presentó el sistema radicular significativamente más pequeño (0,331 g).

Los resultados de la variable peso seco total han sido similares a los del peso seco de la parte aérea: Segura-Alcaraz alcanzó el valor mayor y significativamente superior al resto de las procedencias (1,894 g).

En cuanto a la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz los valores mayores correspondieron a Bermeja, "femia" y Segura-Alcaraz, con valores similares (2,667-2,884) y significativamente superiores a Cuenca, Gredos, Meseta Castellana y Oña, con valores también similares entre sí (2,168-2,042). Esto indica que las tres primeras procedencias tienen un sistema radicular más pequeño que el segundo grupo en relación con el volumen de su parte aérea.

Sierra de Oña es la procedencia que mayor valor de la variable relación longitud parte aérea / peso seco parte aérea ha alcanzado (2,077), lo que indicaría que se trata de una planta menos esbelta que el resto de las procedencias. Por el contrario, la procedencia que ha tenido el valor menor es la de Segura-Alcaraz (1,089). El resto de las procedencias toma valores intermedios.

En cuanto al porcentaje de micorrización sólo se han manifestado diferencias significativas para el porcentaje de micorrización total y para el morfotipo F1. Ambos resultados fueron similares. El origen que tuvo un porcentaje más elevado fue el de Sierra Bermeja (33,055), mientras que Meseta Castellana tuvo el valor más pequeño y significativamente diferente al anterior (22,798). El resto de los orígenes tuvieron valores intermedios.

4.3.6.2. Plantas inoculadas con *Paxillus involutus*

Los resultados de las variables biométricas y de micorrización de las distintas procedencias inoculadas con *Paxillus involutus* se indican en la tabla 37.

Sierra Bermeja, Serranía de Cuenca y Segura-Alcaraz son los orígenes que mayor peso seco de la parte aérea alcanzaron (entre 1,130 g y 1,298 g). Les siguen con valores

significativamente menores el resto de las procedencias, todas ellas del grupo geográfico Atlántico (entre 0,826 g y 0,875 g).

En cuanto a la longitud de la parte aérea, fue Serranía de Cuenca la procedencia que mayor valor alcanzó (145,350 mm), mientras que la longitud más pequeña correspondió a Sierra de Oña (129,500 mm). El resto de los orígenes mantuvieron valores intermedios.

En cuanto a la variable peso seco raíz, el orígen que tuvo un valor mayor fue Sierra Bermeja (0,589 g), seguido de Cuenca, Oña y Segura-Alcaraz (0,526 g, 0,492 g y 0,466 g respectivamente), estos dos últimos con valores muy similares. A continuación les sigue los orígenes de Gredos y Meseta Castellana, mientras que el que tuvo las raíces más pequeñas en comparación con el resto de los orígenes fue "pino femia" (0,351 g).

El peso seco total ofreció resultados semejantes al peso seco de la parte aérea: las procedencias de origen mediterráneo y maghrebí (Cuenca, Segura-Alcaraz y Bermeja) son las que obtuvieron los mayores valores (entre 1,656 g y 1,887 g) mientras que las atlánticas (Gredos, "femia", Meseta Castellana y Oña) quedaron significativamente por debajo (entre 1,177 g y 1,355 g).

Atendiendo a la variable relación peso seco parte aérea / peso seco raíz, Segura-Alcaraz fue la que alcanzó un mayor valor (2,576), significativamente superior al resto de los orígenes, excepto "femia" (2,367), lo que indica que estos dos orígenes son los que tuvieron un sistema radicular más pequeño respecto a su parte aérea. El origen que tuvo el mayor valor fue Sierra de Oña (1,786).

"Femia" fue el origen que alcanzó el mayor valor en cuanto a la relación longitud / peso seco de la parte aérea (1,919), al igual que en el tratamiento control y en el inoculado con *Pisolithus* lo que denota una tendencia de este origen a tener una elevada longitud de la parte aérea en relación con su volumen. Le siguen, con valores cercanos, Gredos, Meseta Castellana y Oña (entre 1,605 y 1,765). El origen que tuvo el valor menor fue Sierra Bermeja (1,175).

La procedencia de Segura-Alcaraz fue la que tuvo el mayor porcentaje de micorrización total (53,883), seguido de Serranía de Cuenca (39,277), mientras que Sierra de Oña fue la procedencia menos micorrizada (27,570). El resto de las procedencias se mantuvieron con valores similares.

En cuanto al porcentaje del morfotipo F1, también fue Segura-Alcaraz el que alcanzó el valor significativamente superior (53,883), mientras que el resto de los orígenes se mantuvieron por debajo de él con valores similares entre sí.

Los morfotipos F5 y FN no mostraron diferencias entre procedencias.

4.3.6.3. Plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius*

Los resultados de las de las distintas procedencias inoculadas con *Pisolithus tinctorius* se indican en la tabla 32.

La procedencia que mayor peso seco de la parte aérea alcanzó fue Segura-Alcaraz con un valor significativamente superior al resto de las procedencias (1,491 g). Les sigue Bermeja y Serranía de Cuenca (1,285 g y 1,152 g respectivamente), mientras que los valores significativamente más pequeños correspondieron a Oña, Meseta Castellana y Gredos (entre 0,885 g y 0,921 g).

En cuanto a la longitud, fue Segura-Alcaraz (148,500 mm) seguido de Sierra de Gredos, Sierra Bermeja y Meseta Castellana las que tuvieron los mayores valores. El resto de las procedencias se desarrollaron menos en longitud, especialmente Sierra de Oña (127,950 mm).

Al igual que en los tratamientos inoculados con *Paxillus*, fue el "pino femia" el origen que tuvo un menor desarrollo del sistema radicular (0,338 g), significativamente por debajo de la mayoría de los otros orígenes. En cambio, los que alcanzaron un mayor peso seco de las raíces fueron Sierra Bermeja, Sierras de Segura-Alcaraz, Serranía de Cuenca y Sierra de Gredos (entre 0,513 g y 0,487 g).

Los mayores pesos secos de la planta completa correspondieron a Segura-Alcaraz y Sierra Bermeja (1,990 g y 1,798 g respectivamente). Meseta Castellana y Sierra de Oña tuvieron los valores más pequeños (1,311 g y 1,303 g respectivamente).

Los resultados en cuanto a la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz fueron muy similares al de los tratamientos inoculados con *Paxillus involutus*: "Femia" y Segura-Alcaraz son los que tuvieron un valor mayor (3,187 y 3,093 respectivamente), mientras que los valores más pequeños correspondieron a Sierra de Gredos y Sierra de Oña (1,880 y 2,162).

Los resultados de la variable relación longitud parte aérea / peso seco parte aérea también ha tenido valores muy similares a los tratamientos inoculados con *Paxillus involutus* y a los no inoculados. Los valores mayores correspondieron a Sierra de Gredos, Sierra de

Oña y Meseta Castellana (entre 1,725 y 1,568) y los más pequeños a Segura-Alcaraz, Sierra Bermeja y Serranía de Cuenca (entre 1,069 y 1,245).

En cuanto a los porcentajes de micorrización, se han detectado diferencias significativas en el porcentaje de micorrización total y en el de los morfotipos F1 y F5. En cuanto al porcentaje de micorrización total, son las procedencias perimediterráneas y la maghrebí (Segura-Alcaraz, Serranía de Cuenca y Sierra Bermeja) las que han tenido un valor más elevado (entre 40,135 y 35,305), mientras que las procedencias atlánticas han tenido valores similares entre sí pero significativamente inferiores (entre 25,729 y 23,712).

Al igual que en el porcentaje de micorrización total, también se ha detectado un mayor porcentaje del morfotipo F1 en las procedencias perimediterráneas y maghrebí, principalmente en Sierra Bermeja (34,956). El resto de las procedencias, las atlánticas, han tenido un porcentaje de micorrización inferior.

El morfotipo F5 ha sido más abundante en Sierra Bermeja (3,053), seguido de Segura-Alcaraz, Meseta Castellana, Serranía de Cuenca y "femia" (entre 1,115 y 0,442), mientras que se ha detectado en Sierra de Gredos y Sierra de Oña.

4.3.7. Descripción de los morfotipos encontrados

A continuación se describen los morfotipos encontrados.

4.3.7.1. Morfotipo F1

4.3.7.1.1. Morfología

Micorrizas de color marrón. Con escasas hifas que emanan. Normalmente dicotómicas o doblemente dicotómicas sin formar estructuras más complejas. Terminaciones regulares, rectas. Sin partículas de suelo adheridas. Abundantes cistidios en forma de aguja con fíbulas en la base. No se observaron rizomorfos.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 1,2-2,2 mm

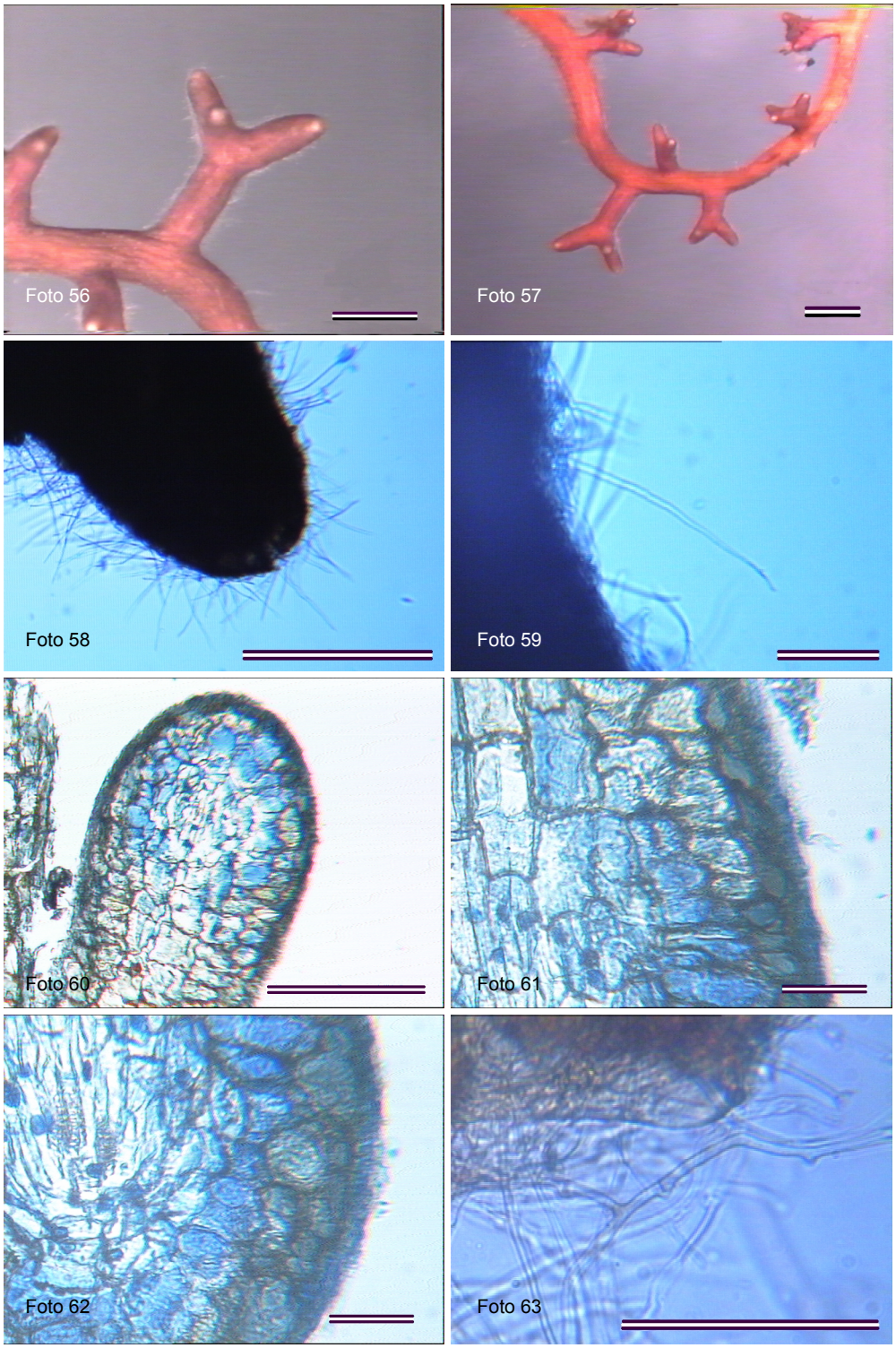
Diámetro del eje principal: 0,3 mm

Longitud de las terminaciones no ramificadas: 0,8-1,2 mm

Diámetro de las terminaciones no ramificadas: 0,2 mm

Longitud de los cistidios: 52-153 mm

Podría corresponderse con un estado precoz de micorrizas de *Telephora terrestris.*



Fotos 56-63.- Morfotipo F1. Fotos 56-57.- micorriza (marca: 1mm). Fotos 58-59.- Cistidios (marca: 50 **m**m). Fotos 60-61.- Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto y la red de Hartig (marca: 50 **m**m). Foto 62.- Corte transversal una micorriza apreciándose el manto, la red de Hartig e hifas intercelulares (marca: 50 **m**m). Foto 63.- Hifas de emanación (marca: 50 **m**m).

4.3.7.1.2. Presencia

Fue la micorriza más común. Se manifestó en todos los tratamientos y con valores elevados, entre 22,80 y 53,88. Unicamente se detectaron diferencias significativas, entre las plantas inoculadas y el control, en las plantas procedentes de Sierras de Segura-Alcaraz, en las que las plantas inoculadas con *Paxillus involutus* alcanzaron valores significativamente más elevados (53,88) y las plantas control los menores (30,03). También se encontraron diferencias significativas entre procedencias.

4.3.7.2. Morfotipo F5

4.3.7.2.1. Morfología

Micorrizas dicotómicas o doblemente dicotómicas, llegando a formar estructuras coraloides, de color marrón grisáceo o amarillento, más oscuras en las más viejas. Superficie lisa, brillante, células corticales no visibles. Frecuentemente con adherencias de partículas de suelo. Terminaciones regulares. Gran profusión de hifas de emanación y rizomorfos tipo "e" que crecen a partir de los extremos de las terminaciones micorrizadas, creando una estructura algodonosa alrededor de ellas. Manto plectenquimático. No se observan esclerocios ni cistidios.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 1,3-3,1 mm

Diámetro del eje principal: 0,6 mm

Longitud de las terminaciones no ramificadas: 0,2-0,4 mm

Diámetro de las terminaciones no ramificadas: 0,2 mm

4.3.7.2.2. Presencia

Fue una micorriza con escasa presencia. Sólo se detectaron diferencias significativas, entre plantas inoculadas y el control, en plantas de la región de procedencia Sierras de Segura-Alcaraz. Entre procedencias se detectaron diferencias significativas únicamente en las plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius*.

4.3.7.3. Morfotipo FN

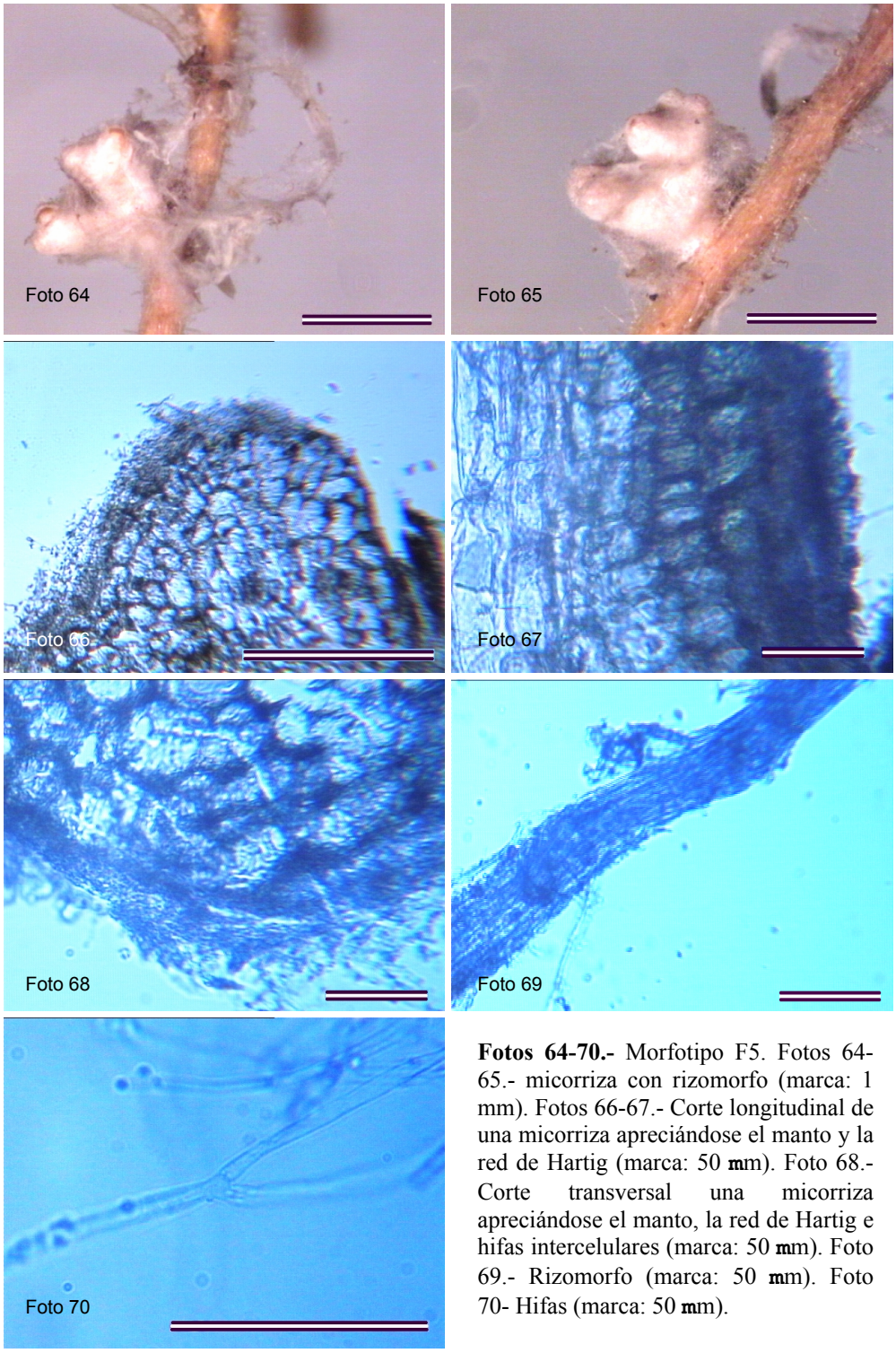
4.3.7.3.1. Morfología

Micorrizas no ramificadas, simples en forma de maza, de color negro de aspecto brillante, con abundates hifas que emanan rectas, no ramificadas, muy oscuras y sin fíbulas. Manto externo plectenquimático con hifas dispuestas de forma radiada. No se han observado rizomorfos no esclerocios.

Longitud de los sistemas micorrícicos: 0,5-2,0 mm

Diámetro del eje principal: 0,2-0,4 mm

Este morfotipo tiene unos caracteres lo suficientemente significativos como para identificarlo como *Cenococcum geophilum*. Se encuentra abundantemente descrita en la literatura (Molina y Trappe, 1982; Agerer y Gronbach, 1988; Torres y Honrubia, 1997;



Fotos 64-70.- Morfotipo F5. Fotos 64-65.- micorriza con rizomorfo (marca: 1 mm). Fotos 66-67.- Corte longitudinal de una micorriza apreciándose el manto y la red de Hartig (marca: 50 mm). Foto 68.- Corte transversal una micorriza apreciándose el manto, la red de Hartig e hifas intercelulares (marca: 50 mm). Foto 69.- Rizomorfo (marca: 50 mm). Foto 70- Hifas (marca: 50 mm).

Bradbury, 1998; Azul y Freitas, 1999; Baxter *et al.*, 1999; de Román y de Miguel, 2000).

4.3.7.3.2. Presencia

Su presencia fue muy escasa. Sólo se detectó en el tratamiento de región de procedencia Sierra de Oña inoculado con *Paxillus involutus*. No se encontraron diferencias significativas entre inóculos ni procedencias.

4.3.7.4. Relación entre porcentaje de micorrización y tamaño de la parte aérea

En la figura 53 se representan las ecuaciones de regresión entre pocentaje de micorrización y peso seco de la parte aérea para cada una de las procedencias estudiadas y para el conjunto de todas ellas.

Como se puede observar en los gráficos, no se ha encontrado una correlación lineal significativa en ninguna de las procedencias, excepto en Segura-Alcaraz en que el coeficiente de correlación lineal tuvo un valor de R^2 = 0,1363 con un valor de P = 0,0037. En esta procedencia un incremento en el porcentaje de micorrización estuvo relacionado con pesos secos de la parte aérea más bajos. Sin embargo, como se desprende del valor R^2, solamente una pequeña fracción de la variación total de los valores de peso seco es debida a la relación lineal con el porcentaje de micorrización. El caso más extremo de ausencia de correlación lineal está representado por la procedencia Meseta Castellana con un valor R^2 = 0,000.

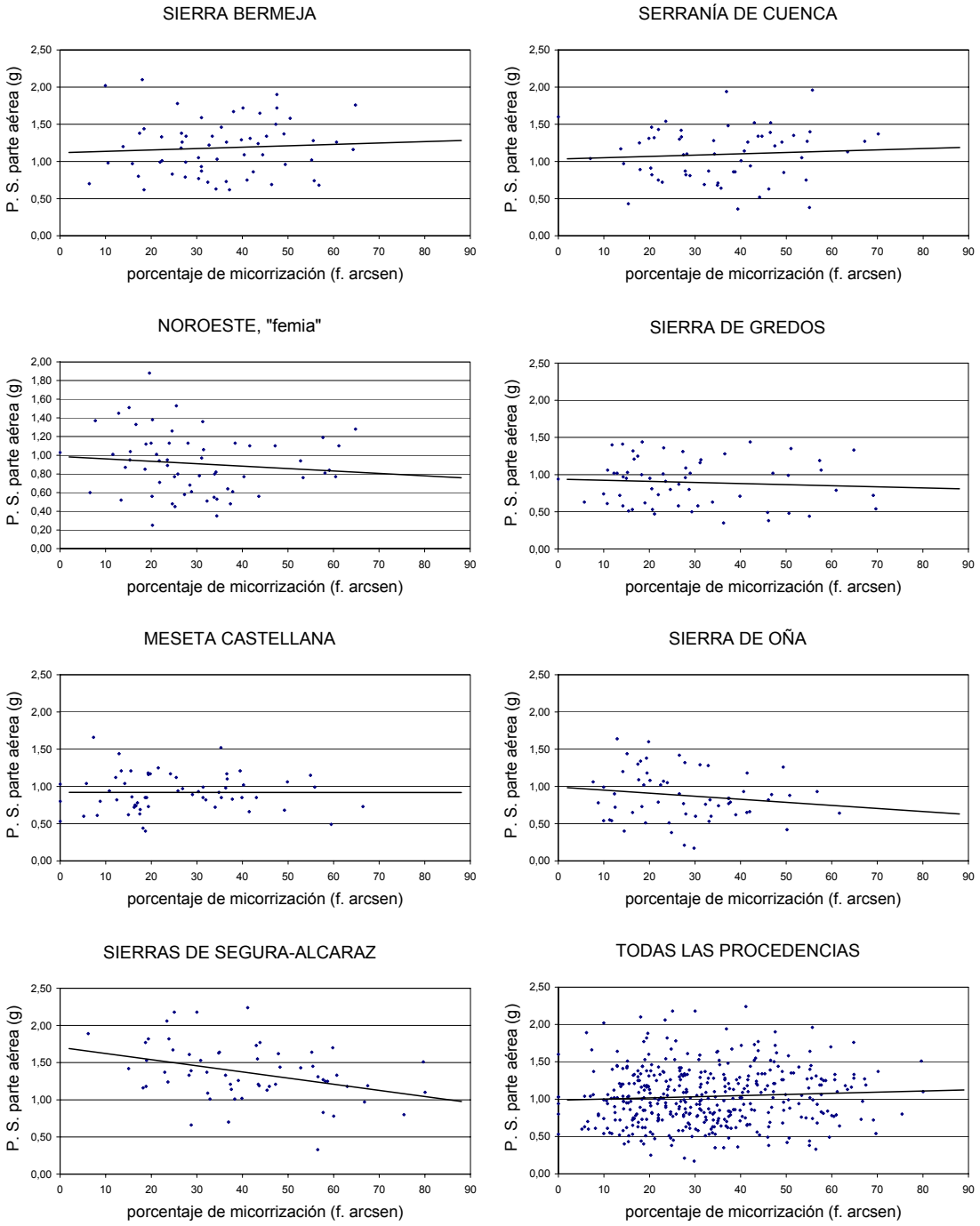


Fig. 53. Modelos de regresión para las distintas procedencias de *Pinus pinaster* Ait. (porcentaje micorrización/peso seco parte aérea).

- Sª Bermeja: $Y = 0{,}00187x + 1{,}11681$; $R^2 = 0{,}0048$; $P = 0{,}5979$
- S. de Cuenca: $Y = 0{,}00177x + 1{,}03175$; $R^2 = 0{,}0056$; $P = 0{,}5700$
- Noroeste, "femia": $Y = -0{,}00259x + 0{,}98661$; $R^2 = 0{,}0133$; $P = 0{,}3796$
- Sª de Gredos: $Y = -0{,}00147x + 0{,}93885$; $R^2 = 0{,}0064$; $P = 0{,}5446$
- Meseta Castellana: $Y = -0{,}00000505x + 0{,}91896$; $R^2 = 0{,}0000$; $P = 0{,}9982$
- Sª. de Oña: $Y = -0{,}00410x + 0{,}99034$; $R^2 = 0{,}0253$; $P = 0{,}2245$
- Sª. Segura-Alcaraz: $Y = -0{,}00828x + 1{,}70607$; $R^2 = 0{,}1363$; $P = 0{,}0037$
- Todas las procedencias: $Y = 0{,}00154x + 0{,}98555$; $R^2 = 0{,}0042$; $P = 0{,}1824$

5. Discusión

5. Discusión

5.1. Influencia del medio de cultivo y el pH sobre el desarrollo de cinco hongos ectomicorrícicos en cultivo *in vitro*

De forma general se ha observado una influencia del medio de cultivo y el pH tanto en la morfología de las colonias como en sus crecimientos.

En relación con el pH, se presenta un cierto contraste con Torres y Honrubia (1991) que, estudiando especies diferentes a éstas, no detectaron correlación entre pH y crecimiento en ninguno de los hongos ensayados, a pesar de que habían estudiado un rango de pH mayor. En este sentido, podemos destacar el crecimiento y la morfología de *Paxillus involutus*, del que se obtuvieron colonias de gran tamaño (41,9 mm de radio medio a los 68 días), que no mostró diferencias significativas atribuibles al pH en MMN y PDA. Esta falta de relación entre pH del medio y crecimiento de las colonias también se ha observado en otros cultivos: *Boletus badius* (Sarria) en Raper (4,0-5,1 mm de radio medio), *Boletus badius* (S. Vicente) en AM (9,7-13,8 mm de radio medio) y Raper (4,0-10,9 mm de radio medio) y *Laccaria laccata* y *Pisolithus tinctorius* en todos los medios utilizados. En estos últimos casos la inexistencia de diferencias significativas podría ser atribuible (1) a la falta de idoneidad del medio de cultivo que enmascara el efecto del pH, principalmente en aquellos tratamientos que han desarrollado colonias de pequeño tamaño, y/o (2) a la gran variabilidad de actividad manifestada por ciertos hongos, principalmente *Laccaria laccata* y *Pisolithus tinctorius*, en los que gran parte de las placas no llegaron a desarrollar colonias.

Atendiendo a la influencia del medio, observamos que MMN ha sido el que ha dado los mejores resultados en todas las cepas excepto la de *Pisolithus tinctorius*, que creció mejor en Raper independientemente del nivel de pH. Este hecho apoya la utilización sistemática del medio MMN en la mayor parte de la investigación con ectomicorrizas (Marx, 1962; Molina y Palmer, 1982; Bellei y Borges, 1990; Pera, 1993; Tranvan *et al.*, 2000).

Entre todas las especies/cepas estudiadas, el aislamiento que produjo los mejores resultados en la totalidad de los medios de cultivo y pH fue *Paxillus involutus*. Cabe destacar un comportamiento específico de esta cepa frente a varios medios de cultivo:

- en medio MMN la velocidad de crecimiento fue muy elevada, ocupando la totalidad de la placa hacia el día 37, cesando posteriormente su actividad por el posible agotamiento de la fuente de alimento.

- en los medios Raper y PDA la velocidad de crecimiento fue inferior pero, en cambio, su actividad fue continua durante 90 días en Raper y 68 días en PDA.

Este hecho pone de manifiesto la utilidad del medio MMN para la producción rápida de inóculo de *Paxillus involutus*, debido a su elevado crecimiento radial, y la de Raper y PDA como medios de conservación.

El medio de cultivo más adecuado de los ensayados para el *Boletus badius* dependió de la cepa utilizada. Mientras que la cepa de Sarria creció mejor en medio MMN, la de San Vicente lo hizo en PDA, principalmente a pH 5.0 y 5.5, poniendo en evidencia las posibles diferencias de cultivo existente entre distintas cepas de una misma especie, como demostraron Laiho, 1970; Molina, 1979; Le Tacon y Bouchard, 1986; Perry *et al.*, 1987; Fernández de Ana-Magán *et al.*, 1995. Esta variabilidad intraespecífica podría corresponderse con la expresión de una variabilidad genética dentro de la misma especie tal como sugirieron Sánchez *et al.* (2000) respecto a *Suillus collinitus* y *Lactarius deliciosus*.

Debido a este comportamiento diferencial de las cepas de *Boletus badius*, sería interesante comparar distintos aislamientos de estas especies procedentes de micotopos con suelos de mayor o menor pH para poder definir la adaptación y adecuación al medio de las mismas y su reflejo en los medios de cultivo.

5.2. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en suelo e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*

A nivel general, todos los orígenes ensayados han tenido un porcentaje de supervivencia muy bajo debido fundamentalmente a la siembra de otoño, a las bajas temperaturas, al exceso de humedad de la estación invernal y a la aparición de problemas fitosanitarios.

Los orígenes que menor porcentaje de supervivencia alcanzaron fueron Sierra Bermeja, Sierras de Segura-Alcaraz y Serranía de Cuenca, todas ellas de origen mediterráneo, la primera del grupo Maghrebí y las otras del grupo Perimediterráneo (Baradat y Marpeau, 1988). El origen con mayor porcentaje de supervivencia fue "pino femia", seguido por el resto de las procedencias del grupo Atlántico. Por tanto, en cuanto a la supervivencia, se observa una clara diferencia de comportamiento dependiendo del origen de la semilla: por un lado los orígenes más meridionales, que presentaron un porcentaje de supervivencia reducido, y por otro los de origen atlántico, con un porcentaje de supervivencia más elevado, destacando principalmente "pino femia", de la región de procedencia Noroeste.

La precocidad de la germinación de Sierra Bermeja y de Segura-Alcaraz, unida a la siembra de otoño, a las suaves temperaturas del mes de noviembre (entre 9,0 y 17,5 ºC) y a su elevada pluviometría (precipitación mensual de 352,6 mm) pudo ser el motivo principal de su escasa supervivencia, ya que esta combinación de factores favoreció que germinara gran parte de las semillas sembradas, que finalmente no habrían sobrevivido a las condiciones invernales debido a su condición juvenil y al ataque de rosquilla negra, a pesar de que el clima de la zona es benigno y la temperatura mínima absoluta durante el periodo del ensayo fue de -1,8 ºC.

Los orígenes del grupo Atlántico manifestaron una mayor adaptación a la zona, como cabía esperar debido a la proximidad climática, que se refleja en un porcentaje de supervivencia más elevado, principalmente de "pino femia", el origen que alcanzó el mayor porcentaje de supervivencia de todos los ensayados.

Es reseñable el comportamiento de Sierra de Oña que, aunque se situó dentro de los valores más bajos en cuanto a peso seco y longitud de la parte aérea, fue la segunda procedencia con mayor porcentaje de supervivencia. Entre las posibles causas de ello cabe analizar el porcentaje de micorrización, el desarrollo del sistema radicular y la velocidad de germinación. Respecto al grado de micorrización, aunque no fue significativamente diferente, tuvo el valor más alto de ápices micorrizados. Si bien el porcentaje de micorrización mostró

una baja correlación lineal con el peso seco y la longitud de la parte aérea, es posible que favoreciera la supervivencia de las plántulas en campo (González Ochoa, 2004). El tamaño del sistema radicular en Oña, que fue evaluado en el ensayo de cultivo en contenedor, mostró una relación peso seco parte aérea / peso seco sistema radical baja en comparación con otros orígenes, lo que podría favorecer también la supervivencia de la especie en condiciones adversas. Por último, cabe destacar que, en el ensayo en contenedor, Sierra de Oña fue la procedencia que tardó más en germinar después de "pino femia", característica que pudo haber sido decisiva para su supervivencia ya que de esta forma habría podido sortear el efecto fatal que el invierno ejerció sobre el resto de los orígenes, en especial sobre Sierra Bermeja.

En cuanto al desarrollo de la parte aérea, atendiendo a las variables de peso seco y longitud, se observa, en general, una mejor adaptación de las procedencias atlánticas a excepción de Oña, es decir, de las procedencias de Noroeste ("femia"), Gredos y Meseta Castellana. En este sentido, el origen más destacado ha sido "femia" que alcanzó los mayores tamaños de la parte aérea, aunque sin separarse significativamente de Meseta Castellana y Gredos.

Después de realizar el análisis de las raíces en el laboratorio, aunque se detectó un alto porcentaje de micorrización, no se descubrieron morfotipos de los hongos inoculados en la siembra. Este hecho pudo deberse al poco tiempo transcurrido entre la siembra y el muestreo final, quizá demasiado escaso como para formar micorrizas con todas sus estructuras diferenciadoras que nos permitieran discriminar entre los distintos morfotipos existentes, y/o a la posible variabilidad morfológica de las micorrizas debido a las condiciones externas o al tipo de planta huésped (Alexander, 1981; Miller *et al.*, 1991; Agerer, 1991; Pillukat, 1992), por lo que sería posible que alguno de los morfotipos descritos se correspondiera con algún hongo inoculado pero que no pudieran ser identificados debido a la escasez bibliográfica de descripciones de micorrizas en *Pinus pinaster*.

Se observa que las plantas cultivadas en suelo no respondieron, en cuanto al porcentaje de micorrización, de forma similar que en el ensayo en contenedor. Mientras que las plantas más micorrizadas en contenedor fueron Segura-Alcaraz, Cuenca y Bermeja, en suelo tomaron valores diferentes, especialmente Bermeja, que fue el origen menos micorrizado, aunque los datos pudieran haberse visto muy influidos por el escaso número de datos. Oña, que era una de las procedencias menos micorrizadas en contenedor, fue la que mayor porcentaje de micorrización alcanzó en suelo. En cambio, "femia" y Meseta Castellana respondieron de forma similar en suelo y en contenedor, manteniéndose siempre con valores de micorrización modestos, en comparación con el resto de las procedencias.

En cuanto a la influencia del porcentaje de micorrización sobre el crecimiento, en general se aprecia un efecto positivo de la micorrización sobre el peso seco y la longitud de la parte aérea, al igual que en los ensayos realizados por Gautry *et al*. (1991) en los que inocularon *Hebeloma crustiliniforme*, *Laccaria laccata* y *Paxillus involutus* en plantas de *Pseudotsuga menziesii*. Sin embargo, cabe señalar la baja correlación lineal en muchos de los orígenes ensayados, por lo que lo que sólo se podría afirmar la existencia de un efecto positivo de la micorrización sobre el tamaño de la parte aérea en las procedencias de Sierra Bermeja y Meseta Castellana. Una baja correlación también fue detectada por González-Ochoa *et al*. (2003) en la inoculación de *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster* con *Pisolithus tinctorius*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Suillus mediterranensis*, *Suillus collinitus*, *Suillus bellini* y *Rhizopogon roseolus*, en la que los mayores coeficientes de correlación no alcanzaron el 20 %.

En cuanto al cultivo en suelo, es destacable el comportamiento de Sierra Bermeja en lo que respecta a la micorrización, ya que ofreció resultados diferentes en función del morfotipo analizado. Fue la procedencia que menor porcentaje del morfotipo L1 alcanzó, pero, en cambio, fue la que obtuvo el mayor porcentaje del morfotipo L2, por lo que se observaría un comportamiento diferencial, respecto al resto de las procedencias, en cuanto a su afinidad micorrícica.

El "pino femia" es el origen que mostró una mayor adaptación a las condiciones climáticas y edáficas de la zona de estudio en el ensayo de cultivo en suelo, posiblemente debido a su proximidad geográfica, que se pone de manifiesto por su superioridad tanto en el desarrollo aéreo como en el porcentaje de supervivencia. Sin embargo, las cifras de porcentaje de micorrización se mantuvieron en valores intermedios, incluso por debajo de Oña, Gredos, Cuenca y Segura.

Por tanto, la adaptación del "pino femia" a esta zona se expresa fundamentalmente con un aumento del porcentaje de supervivencia y con un mayor desarrollo de la planta, pero no con un mayor porcentaje de micorrización ni una presencia mayor de morfotipos, como en un principio se podría suponer debido a la proximidad geográfica y, por consiguiente, debido a una mayor afinidad o compatibilidad con la flora ectomicorrícica natural. Aunque, precisamente debido a esa adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona, el "pino femia" pudiera ser menos dependiente de la simbiosis micorrícica.

5.3. Evaluación de siete orígenes ibéricos de *Pinus pinaster* Ait. sembrados en contenedor utilizando técnicas convencionales de propagación de planta forestal e inoculados con *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus*

Atendiendo a la velocidad de germinación, se han observado distintos patrones de crecimiento en función de la procedencia de que se trate. Así, las semillas procedentes de regiones fitoclimáticas cercanas al mediterráneo genuino (Sierras de Segura-Alcaraz y Sierra Bermeja) tienen una mayor velocidad de germinación, mientras que los orígenes del grupo Atlántico (Sierra de Gredos, Meseta Castellana, Sierra de Oña y Noroeste "pino femia") tienen un desarrollo inicial más lento. La procedencia de Serranía de Cuenca se puede considerar un grupo de transición.

Estas características germinativas se podrían considerar una estrategia de adaptación con el fin de alcanzar rápidamente un sistema radicular lo suficientemente profundo, durante el corto periodo de tiempo que duran las condiciones favorables para la germinación, principalmente en cuanto a humedad del suelo, con el que poder extraer agua del suelo y hacer frente a los rigores de la época estival. Un hecho similar, entre especies, sucede si se comparan las características germinativas de *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster* (Peñuelas y Ocaña, 2000). Aunque el *Pinus halepensis* es una especie de clima cálido-templado, su temperatura óptima de germinación parece ser menor que la de *Pinus pinaster*. De esta forma, la germinación de las semillas de *Pinus halepensis* se produciría al principio de la primavera, teniendo tiempo suficiente para desarrollar un sistema radicular adecuado para afrontar el verano.

Este comportamiento diferencial puede asociarse con el grupo geográfico de origen de la semilla. Las procedencias de los grupos Maghrebí y Perimediterráneo se caracterizan por una velocidad de germinación elevada, mientras que las del grupo Atlántico, principalmente "pino femia", por lo contrario. Otros caracteres de crecimiento y adaptación al medio, como el crecimiento en altura o diámetro o la tendencia al policiclismo, se han asociado también al grupo geográfico de origen de la semilla (Alía y Moro, 1996).

En cuanto a la evolución del crecimiento en altura de la parte aérea, durante todo el periodo del ensayo se han observado tres fases perfectamente definidas: la primera, una parada de crecimiento que tiene lugar entre la segunda y la tercera quincena después de la germinación; la segunda, una etapa de gran desarrollo que se prolonga hasta la fase de endurecimiento, sexta quincena; y la tercera, una etapa de ralentización del crecimiento en altura e incremento del grosor del tallo. Las tres fases observadas responden a tres periodos

normales en el desarrollo de las plántulas: tras la rápida elongación de la radícula y del hipocotilo y cuando la germinación llega a su fin, las reservas alimenticias contenidas en las células del gametofito femenino se han consumido, y la plántula debe realizar las transformaciones necesarias para funcionar como una planta completamente independiente y capaz de sintetizar su propio alimento, por lo que comienza una fase caracterizada por un elevado desarrollo radicular que se refleja exteriormente en una ralentización del crecimiento de la parte aérea (fase 1). A continuación, una vez que la plántula ha alcanzado un volumen radicular adecuado, el desarrollo se traslada hacia la parte aérea produciéndose una rápida elongación del epicotilo con el consiguiente desarrollo de las hojas primarias y un crecimiento resaltable en altura (fase 2) (Tepper, 1964). Estas primeras fases se caracterizan por el crecimiento primario de los tejidos. Antes de terminar la primera estación de crecimiento, en el momento en el que comienza la fase de endurecimiento, se inicia el crecimiento secundario como resultado de las divisiones de las células del cambium (Niembro, 1986). Este cambio se manifiesta con una parada de crecimiento en longitud y un elevado incremento del diámetro del tallo (fase 3), así como con la sustitución de la epidermis por la peridermis (Esau, 1965), lo que le confiere una consistencia leñosa.

En función de la intensidad y de la fecha de las dos primeras fases descritas, las distintas procedencias ensayadas se pueden clasificar en dos grupos. Un primer grupo (grupo 1) formado por las procedencias de Sierra Bermeja y Sierras de Segura-Alcaraz, con una parada vegetativa muy importante en la tercera quincena después de la siembra y con un crecimiento posterior, en la segunda fase, moderado; y un segundo grupo (grupo 2) formado por Serranía de Cuenca, Sierra de Gredos, Meseta Castellana, Sierra de Oña y Noroeste "femia", en el que la primera fase tiene lugar hacia la cuarta quincena después de la siembra y con un crecimiento, en la segunda fase, superior. Cabe señalar el comportamiento de Serranía de Cuenca en la primera fase descrita, que lo podría situar como una procedencia intermedia entre los dos grupos citados.

Se observa que las distintas procedencias se agrupan de la misma forma atendiendo a la velocidad de germinación y al estudio de la evolución del crecimiento. Esto es debido a que el adelanto de la germinación en 15 días en las procedencias de Sierra Bermeja y Sierras de Segura-Alcaraz, provoca un adelanto en el tiempo de las fases de crecimiento citadas. Sin embargo, esta fecha no es la única característica diferenciadora. La magnitud del crecimiento en cada una de las fases nos permite agrupar las procedencias de Sierra Bermeja y Sierras de Segura-Alcaraz ya que poseen incrementos de crecimiento quincenales prácticamente idénticos.

Tapias *et al.* (2004), estudiando características relacionadas con el comportamiento ante los incendios de 28 orígenes de *Pinus pinaster* en Río Frío (Ciudad Real) mediante el análisis cluster (taxonomía numérica), también encontró una gran proximidad entre ciertos orígenes de las regiones de procedencia de Sierra Bermeja y Segura-Alcaraz.

La división en grupos geográficos realizada por Baradat y Marpeau (1988), también es coincidente con la clasificación de las procedencias ensayadas en función de su comportamiento en las primeras fases de crecimiento. De esta forma, las procedencias de origen Perimediterráneo y Maghrebí, según Baradat y Marpeau, se corresponderían con el modelo definido como grupo 1 en este trabajo, mientras que los representantes del grupo Atlántico corresponderían al 2. Serranía de Cuenca podría considerarse una procedencia de transición entre ambos grupos.

A nivel general, se han obtenido resultados aceptables de porcentaje de micorrización, con medias que oscilan entre el 19 % y el 63 %, aunque cabe señalar que en ningún caso se han identificado de forma inequívoca micorrizas de los hongos inoculados, ni se han detectado diferencias significativas entre tratamientos de inoculación en ninguna procedencia excepto en Segura-Alcaraz. A pesar de ello, se han observado ciertos comportamientos diferenciales en cuanto a los incrementos quincenales de la parte aérea entre los tratamientos de inoculación de las distintas procedencias, que podrían ser atribuibles a la etapa de infección de la simbiosis micorrícica (identificable como una depresión del crecimiento) (Trappe, 1977; Castellano y Trappe, 1985; Plenchette, 1990; Plassard *et al*., 2004) o al efecto favorable de las micorrizas (manifestado externamente con un mayor crecimiento en altura). Este comportamiento de las procedencias, en particular durante la fase de invernadero, sugeriría la existencia de una actividad inicial del hongo inoculado. El hecho de no haber descrito más que tres morfotipos diferentes, y ninguno coincidente con los inoculados, podría deberse a una posterior infección con inóculos naturales más agresivos que hubieran ocultado o desplazado al hongo inoculado (Lee y Koo, 1992); o porque, en el momento en que se llevó a cabo el muestreo, las micorrizas no estuvieran lo suficientemente desarrolladas y diferenciadas para permitir discriminarlas; o, al igual que en el ensayo en suelo, debido a la posible variabilidad morfológica de las micorrizas en función de la planta huésped de que se trate (Alexander, 1981; Miller *et al.*, 1991; Agerer, 1991; Pillukat, 1992), lo que habría impedido identificar los morfotipos basándose en descripciones ya publicadas, dado que la mayor parte de éstas utilizan plantas huéspedes distintas de *Pinus pinaster*.

La mayor parte de las procedencias han mostrado una ralentización del crecimiento en las primeras fases de desarrollo en algún tratamiento de inoculación, que podría ser imputado

a un efecto depresivo en la fase de infección micorrícica. En concreto, se ha apreciado una disminución significativa del crecimiento durante el primer mes de cultivo en los tratamientos inoculados con *Pisolithus tinctorius* en la procedencia de Oña, con *Paxillus involutus* en Sierra de Gredos, Segura-Alcaraz y "femia" y con ambos inóculos en Sierra Bermeja. Respecto al crecimiento de las plántulas en las fases siguientes del desarrollo, se observa una ralentización general de los tratamientos control en todas las procedencias excepto en Serranía de Cuenca, aunque estas diferencias no se detecten en la altura final de las plantas, excepto en Sierra Bermeja.

En función de lo dicho, es evidente que existen ciertos comportamientos en el crecimiento de las plantas que dependen del tratamiento de inoculación utilizado y que serían achacables a la simbiosis micorrícica, como es la ralentización del crecimiento de los tratamientos inoculados en las primeras fases del cultivo debido al proceso de infección micorrícica o su incremento en algún momento de la vida de la planta debido a los efectos positivos.

En cuanto a las variables analizadas al final del ensayo, se puede afirmar que la inoculación tuvo una influencia positiva sobre las variables biométricas, de tal forma que las plantas inoculadas con *Paxillus* o *Pisolithus* tuvieron, en general, un desarrollo mayor que las no inoculadas. Se observa el mismo efecto analizando la evolución de los crecimientos quincenales ya comentados en el que, en general, los tratamientos inoculados manifestaron desarrollos quincenales mayores tanto en la fase de cultivo en invernadero como en la de exterior. Sin embargo, este efecto sobre el tamaño de las plantas no se refleja de forma proporcional sobre el porcentaje de micorrización ya que, aunque éste fue elevado, no se han observado diferencias significativas entre inóculos. Este hecho está en la línea de los resultados obtenidos por Pera (1993), el cual, inoculando plantas de *Pinus pinaster* con esporas de *Pisolithus tinctorius*, detectó diferencias significativas en altura de las plantas, peso seco de la raíz y relación parte aérea / parte radical entre distintos tratamientos de inoculación, aunque no pudo establecer una correspondencia entre estas diferencias y el estado micorrícico de las plantas. Esto podría tener relación con un efecto diferencial de las micorrizas sobre la planta huésped (Trappe, 1977; Le Tacon *et al.*, 1992), de tal forma que distintas micorrizas produjeran efectos diferentes sobre la planta.

El hecho de haber encontrado diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y los controles en algunas variables biométricas, como altura y peso seco, y no haber detectado en cambio diferencias en el estado micorrícico final de las plantas, puede ser achacable a la acción de hongos ectomicorrícicos naturales de gran agresividad que

infectarían las plantas después de haberlo hecho el hongo inoculado. En las primeras etapas de crecimiento los únicos hongos ectomicorrícicos presentes y activos en la rizosfera serían los inoculados artificialmente, provocando efectos positivos o negativos sobre las plantas, según el caso, que serían detectados en la evolución de crecimientos quincenales. Una vez que se produce la infección debido al inóculo natural de hongos ectomicorrícicos más agresivos que los inoculados artificialmente, éstos serían desplazados rápidamente. Algunas veces el efecto positivo o negativo inicial de los hongos inoculados es tan patente que persiste hasta el final del ensayo, como ocurre con Sierra Bermeja, Sierra de Gredos o Sierras de Segura-Alcaraz en las que se observa un mayor crecimiento de los tratamientos inoculados tanto durante la etapa de crecimiento (incrementos de longitud quincenales) como al final del ensayo. En otras, el efecto de los hongos naturales acabarían enmascarando el efecto inicial del hongo inoculado como ocurre con Sierra de Oña, en la que, aunque se percibe un menor desarrollo en altura del tratamiento control durante el periodo de crecimiento, no se detectan diferencias significativas al final del ensayo.

El hecho de que se haya detectado un único morfotipo abundante y otros dos en muy pequeña proporción y que no se pudieran atribuir a los tratamientos de inoculación se podría interpretar de diferentes maneras. Por un lado se podría inferir, como ya se ha dicho, que en la fecha en la que se realizó el muestreo las micorrizas no estaban lo suficientemente desarrolladas como para distinguir perfectamente unos morfotipos de otros, de ahí que se hubiera detectado un morfotipo común en todos los tratamientos. Este morfotipo, nombrado como F1, podría corresponderse con *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius* y/u otros inóculos naturales, provocando sobre las plantas efectos diferentes según su tipo y proporción. Esto explicaría las diferencias biométricas detectadas entre inóculos dentro de cada procedencia, sin haber detectado, en cambio, diferencias en el porcentaje de micorrización en ninguna procedencia excepto en Sierras de Segura-Alcaraz. Además, el hecho de que las raíces estuvieran formadas por distintas proporciones de las especies micorrícicas mencionadas, aún teniendo el mismo porcentaje de micorrizas global, sería el responsable de la respuesta diferencial entre tratamientos de inoculación dentro de cada procedencia. Por otro lado, la desmesurada proliferación de los hongos naturales pudo acabar ocultando o desplazando totalmente a los hongos inoculados, de ahí que no se hubieran observado diferencias en el estado micorrícico de las raíces.

Cabe destacar el comportamiento de la procedencia Sierras de Segura-Alcaraz, ya que fue la única procedencia que mostró porcentajes de micorrización significativamente diferentes entre tratamientos de inoculación. El tratamiento que mayor porcentaje de

micorrización tuvo, el de *Paxillus*, fue el que menor crecimiento de la parte aérea experimentó, mientras que el que alcanzó el mayor desarrollo de planta, *Pisolithus*, tuvo el menor porcentaje de ápices micorrizados. Este efecto sobre el desarrollo podría resultar contradictorio si consideramos la estimulación del crecimiento como el único o más importante efecto que la micorriza produce sobre la planta. El efecto beneficioso de las micorrizas sobre las plantas ha sido ampliamente demostrado por innumerables investigadores y se sitúa en varias vertientes (absorción de minerales y agua, modificación del equilibrio hormonal, protección frente a patógenos…). La estimulación del crecimiento en la fase de vivero no tiene porqué ser el único efecto positivo de la micorrización ni el objetivo de estas técnicas, sino la respuesta al trasplante valorable por una disminución de la mortalidad tras la plantación y la aceleración del crecimiento inicial de las plantas (Thomas y Jackson, 1983). La significación de las diferencias obtenidas entre tratamientos podría ser mayor si se prolongaran los ensayos en el tiempo, introduciendo la fase postrasplante, ya que se podrían percibir efectos cualitativa y cuantitativamente diferentes a los observados en la fase de crecimiento en vivero. En este caso, dado que el tratamiento con mayor porcentaje de micorrización se corresponde con el de menor crecimiento, se podría haber dado un caso de depresión del crecimiento. Este efecto fue detectado por varios investigadores (Trappe, 1977; Castellano y Trappe, 1985; Plenchette, 1990; Plassard *et al*., 2004), y es atribuido al consumo de sustancias carbonatadas por parte del hongo micorrícico.

Las procedencias de los grupos geográficos Perimediterráneo y Maghrebí, Sierras de Segura-Alcaraz, Serranía de Cuenca y Sierra Bermeja, son las que han obtenido los máximos valores de peso seco de la parte aérea, así como unas de las que mayor peso seco del sistema radicular han alcanzado y las de menor relación longitud / peso seco parte aérea**.** Las regiones de procedencia de estas semillas poseen climas cálidos en verano y escasas precipitaciones, por lo que se podría deducir que estas características serían una consecuencia adaptativa a estas condiciones, ya que una mayor lignificación y/o un rápido desarrollo después de la germinación le permitiría afrontar con garantías la época estival.

Los resultados en cuanto a la longitud de la parte aérea, no coincidieron con los obtenidos en peso seco, por lo que se puede afirmar que longitudes de la parte aérea elevadas no se corresponderían con pesos secos de la parte aérea mayores. Este hecho se aprecia en las procedencias mediterráneas, que tuvieron las relaciones longitud / peso seco parte aérea más bajas de todas las estudiadas, es decir, se caracterizarían por plántulas de menor talla y diámetros de tallo o superficie foliar elevados, o por plántulas más lignificadas. Cabe señalar, respecto a esta última variable, relación longitud / peso seco parte aérea, que no ha habido

significación en la interacción inóculo x procedencia lo que indica que esta característica morfológica es únicamente efecto de la procedencia y no del tratamiento de inoculación. Sin embargo, en el experimento en suelo no se han observado diferencias tan evidentes respecto a esta variable. Es significativo que la procedencia de Oña alcanzara los valores más elevados de esta variable tanto en el experimento en suelo como en contenedor.

En aquellas procedencias y variables en las que se detectaron diferencias significativas entre tratamientos de inoculación, se observa una tendencia por parte de los tratamientos inoculados con *Paxillus involutus* a desarrollar principalmente el sistema radicular, mientras que la inoculación con *Pisolithus tinctorius* se refleja principalmente en la parte aérea. Así, en cuanto a la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz, los tratamientos inoculados con *Paxillus* tuvieron valores significativamente por debajo de los de *Pisolithus* (lo que indica una raíz más desarrollada en relación con su parte aérea) en las procedencias de Segura-Alcaraz, Oña, Meseta Castellana, "femia" y Sierra Bermeja. Además, en esta última procedencia, la variable peso seco raíz fue significativamente superior en *Paxillus* que en *Pisolithus*. En ningún caso los tratamientos inoculados con *Pisolithus* tuvieron sistemas radiculares mayores que los de *Paxillus*. Las procedencias de Gredos y Segura-Alcaraz tuvieron alturas de la parte aérea significativamente superiores en los tratamientos inoculados con *Pisolithus* que en los de *Paxillus*. El mismo efecto se observó en la procedencia Segura-Alcaraz con respecto a la variable peso seco de la parte aérea. En cuanto a la variable relación peso seco parte aérea / peso seco raíz, los tratamientos de *Pisolithus* tuvieron valores significativamente superiores que los de *Paxillus* en las procedencias de Segura, Oña, Meseta Castellana, "femia" y Bermeja, lo que indica un desarrollo elevado de la parte aérea respecto al volumen de su sistema radicular. Gautry *et al*. (1991) detectaron incrementos de la relación parte aérea / peso seco raíz en aquellas plantas de *Picea abies* que habían sido inoculadas con *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustiliniforme*, mientras que Trappe (1977) observó que *Pisolithus tinctorius* reducía la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz en plántulas de *Tsuga heterophylla*.

Comparando entre procedencias, "pino femia" es la que menor peso seco de raíz ha tenido en todos los tratamientos de inoculación. Además, también ha tenido en todos los casos uno de los porcentajes de micorrización más pequeños y las mayores relaciones peso seco parte aérea / peso seco raíz. Este hecho podría estar condicionado por sus características genotípicas o por la adaptación de las plantas al medio. En el segundo caso, la proximidad geográfica y por tanto la mayor adaptación al medio de "pino femia" tendría un efecto negativo sobre el desarrollo del sistema radicular y sobre su calidad micorrícica. "Pino

femia", debido a su proximidad geográfica, estaría más adaptado a las condiciones climáticas de la zona y por tanto no tendría una dependencia tan grande de la simbiosis micorrícica como los pinos de otras procedencias menos adaptados. Por tanto, la proximidad geográfica, que en un principio podría ser considerada como un valor positivo para la simbiosis micorrícica debido a una mayor afinidad hongo-huésped, podría tener un efecto contrario ya que, simplemente, la planta tiene menos necesidad de ella para sobrevivir. "Pino femia" ha tenido un comportamiento parecido en el experimento realizado en suelo, en el que obtuvo uno de los mayores valores en cuanto a desarrollo de la parte aérea y longitud, mientras que no se detectaron diferencias significativas respecto al resto de las procedencias en cuanto al porcentaje de micorrización.

Los mayores porcentajes de micorrización correspondieron a las procedencias de Sierra Bermeja, Sierras de Segura-Alcaraz y Serranía de Cuenca. Este hecho podría tener dos explicaciones, al igual que el comportamiento ya mencionado de "pino femia":

- La primera apoyaría la hipótesis de adaptación al medio. Como se tratan de regiones de procedencia muy alejadas fitoclimáticamente de la región Noroeste donde se realizó el ensayo, son especies menos adaptadas y, por tanto, tienen una mayor dependencia de la simbiosis micorrícica lo que les hace tener un porcentaje de micorrización mayor.
- La segunda, no dependería ya de la mayor o menor adaptación a la zona, sino que sería una solución adaptativa a su medio original y estaría regulado genéticamente. Las tres procedencias pertenecen a climas mediterráneos lo que propiciaría la búsqueda de algún tipo de adaptación a las condiciones edafoclimáticas de su zona de origen, como podría ser una mayor predisposición a la simbiosis micorrícica que las procedencias atlánticas.

En el ensayo realizado en suelo, en cambio, las plantas procedentes de Sierra Bermeja fueron las que tuvieron el porcentaje de micorrización menor, seguido de las de la Meseta Castellana. A pesar de ello, los porcentajes de micorrización de este ensayo estuvieron muy por encima a los del ensayo desarrollado en contenedor, independientemente del tratamiento de inoculación y del origen de la semilla. Este hecho podría ser explicado de diversas formas:

- Las condiciones ambientales más desfavorables, no limitantes, favorecen el desarrollo de micorrizas. De ahí el elevado porcentaje de micorrización de las plantas desarrolladas en suelo frente a las desarrolladas en contenedor.

- Los bajos niveles nutricionales existentes en el cultivo en contenedor, pudieron ser un factor limitante en el desarrollo micorrícico lo que provocaría un porcentaje de micorrización inferior respecto al ensayo desarrollado en suelo natural.
- Las plantaciones realizadas en suelo natural y a la intemperie están sometidas a una mayor cantidad de inóculo que los cultivos desarrollados en contenedor y bajo abrigo, a pesar de haber sido inoculados artificialmente.
- El ensayo desarrollado en suelo natural tuvo una duración mayor que el ensayo en contenedor lo que permitiría que las plantas estuvieran un mayor tiempo en contacto con el inóculo y que desarrollara una mayor cantidad de micorrizas.

Tras analizar los modelos de regresión, cabe señalar la diferencia de resultados existentes entre el ensayo en contenedor y el ensayo en suelo. Mientras que en el ensayo realizado en contenedor no se ha observado una correlación clara entre el número de ápices micorrizados y el tamaño de la parte aérea, en el caso de las plantas establecidas en suelo se ha llegado a coeficientes de correlación elevados de hasta $R^2 = 0,7949$, en la procedencia de Sierra Bermeja.

La diferencia fundamental entre el ensayo realizado en suelo natural y el realizado en contenedor reside en el medio en el que se han desarrollado. Por un lado un medio natural, no controlado, con condiciones de humedad, temperatura, insolación, viento, etc., cambiantes y en muchos casos inadecuados y, por otro, un medio controlado con unas condiciones climáticas y unas características físicas del sustrato muy cercanas a los valores óptimos, combinados con unas coacciones importantes como es el reducido espacio del sistema radicular y los bajos niveles nutricionales, por debajo de los recomendados.

Se sabe que las micorrizas son especialmente beneficiosas en condiciones de estrés debido a la escasez de agua o de algún elemento fertilizante (Dixon *et al*., 1980; Waring y Schlesinger, 1985; Finlay y Read, 1986a, 1986b; Cooke y Whipps, 1993), mientras que en condiciones favorables el efecto beneficioso es menor. En el caso del cultivo en contenedor, aunque los factores ambientales estresantes fueron reducidos, las carencias nutricionales del sustrato pudieron ser un factor decisivo en el desarrollo de la simbiosis micorrícica porque, a pesar de que los bajos niveles nutricionales favorecen el desarrollo micorrícico, niveles excesivamente bajos actuarían como un factor limitante que reduciría las diferencias existentes entre los distintos tratamientos y el efecto de las micorrizas sobre el crecimiento de las plantas. En el caso de la plantación en suelo, los factores condicionantes han sido múltiples, por lo que el estado micorrícico podría resultar de relevancia en cuanto a la

adaptación de las plantas a un medio en muchos casos hostil, lo cual tendría un efecto externo cuantificable, como así ha sido.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

- Las características macroscópicas utilizadas en la caracterización morfológica de las distintas cepas fúngicas (textura y color del micelio, borde de las colonias, pigmentación del medio, etc.) permiten identificar con suficiente exactitud los cultivos de *Boletus badius* y *Laccaria laccata* utilizadas en el ensayo independientemente del medio nutritivo y del pH empleados. Por el contrario, en el caso de *Paxillus involutus* y *Pisolithus tinctorius*, es necesario indicar el medio de cultivo utilizado ya que éste influye de forma ostensible en su morfología.
- Para optimizar la producción de inóculo de las distintas cepas estudiadas se recomiendan las siguientes combinaciones de medio y pH:
  - *Boletus badius* (Sarria): MMN a pH 5.5, 6.0 y 5.0
  - *Boletus badius* (S. Vicente): MMN a pH 6.0 y PDA a pH 5.0
  - *Paxillus involutus*: MMN a pH 5.0, 5.5, 6.0; PDA a pH 5.0, 5.5, 6.0 y Raper a pH 6.5.
  - *Laccaria laccata*: MMN a pH 6.0, 5.5 y 5.0
  - *Pisolithus tinctorius*: Raper a pH 6.5, 7.0, 7.5 y Agar-malta a pH 5.5.
- Dentro de los pH estudiados en este trabajo se observa una preferencia por los pH más bajos en el caso de *Boletus badius*, *Paxillus involutus* y *Pisolithus tinctorius*, y por los más elevados en el caso de la *Laccaria laccata*
- El comportamiento de las procedencias ensayadas de *Pinus pinaster* Ait. respecto a las variables biométricas estudiadas apoya, en parte, la división geográfica de sus poblaciones realizada por Baradat y Marpeau (1988). Sierra de Gredos, Meseta Castellana, Sierra de Oña y Noroeste "pino femia" tienen un comportamiento similar por lo que pertenecerían a un mismo grupo (1), que coincide con el grupo Atlántico sugerido por los autores mencionados. Las procedencias de Sierras de Segura-Alcaraz y Sierra Bermeja (2) tuvieron comportamientos prácticamente idénticos, aunque Baradat y Marpeau las incluyen en el grupo Perimediterráneo y el Maghrebí respectivamente. Serranía de Cuenca, también Perimediterráneo, se podría considerar una procedencia de transición entre 1 y 2 debido al comportamiento observado en los primeros meses de cultivo.

- La velocidad de germinación es una característica que depende del origen de la semilla. Este comportamiento va ligado a las condiciones ambientales en las que se desarrolla cada uno de estos orígenes en su medio natural.
- Las plantas cultivadas en campo han tenido porcentajes de supervivencia muy bajos, posiblemente debido a la época de siembra (otoño). Noroeste, "pino femia", es la procedencia que mejor se adaptó a las condiciones del invierno en Galicia presentando un fuerte retraso en la germinación. Las procedencias de origen mediterráneo, en cambio, han tenido un desarrollo muy precoz por lo que se han visto más expuestas a las condiciones climáticas adversas del invierno, lo que ha influido negativamente en su supervivencia.
- La evolución del crecimiento en altura ha seguido un patrón similar en todas las procedencias, independientemente de los tratamientos de inoculación, distinguiéndose tres fases claramente diferenciadas. La primera fase ocurre entre la segunda y tercera quincena después de la germinación en que se produce una ralentización del crecimiento en altura que podría ser atribuible al agotamiento de las reservas energéticas de la semilla y a la necesidad de desarrollar un sistema radicular adecuado para el crecimiento de la planta. La segunda fase se caracteriza por un gran crecimiento en altura de la parte aérea de la planta que dura hasta la sexta quincena. La tercera fase se caracteriza por la lignificación y engrosamiento del tallo y por una reducción paulatina del crecimiento en altura hasta que se hace nulo.
- En general, el porcentaje de micorrización influye de forma positiva sobre el crecimiento de las plantas en suelo, mientras que en condiciones controladas, de cultivo en contenedor, no se observa correlación entre el porcentaje de micorrización y el crecimiento de las plantas.
- La correlación observada entre el porcentaje de micorrización y el crecimiento de las plantas de pino cultivadas en suelo varió según procedencias, siendo las procedencias de Sierra Bermeja y Meseta Castellana las que tuvieron los coeficientes de correlación más altos.
- En el cultivo en suelo, Sierra Bermeja manifestó mayor presencia del morfotipo L2 que el resto de las procedencias estudiadas.
- En el experimento de cultivo en contenedor, se han apreciado diferencias significativas en la evolución del crecimiento de la parte aérea (crecimientos

quincenales), en los primeros meses de vida, entre tratamientos de inoculación en todas las procedencias estudiadas excepto en Serranía de Cuenca. A pesar de ello, en el muestreo final sólo se han detectado diferencias en cuanto al porcentaje de micorrización en las plantas de la región de procedencia Sierras de Segura-Alcaraz.

- En el experimento en contenedor, los tratamientos de inoculación con *Paxillus involutus* y con *Pisolithus tinctorius* tuvieron un efecto diferente respecto a la relación peso seco parte aérea / peso seco raíz. Los tratamientos inoculados con *Paxillus involutus* mostraron un mayor volumen del sistema radicular en relación con el volumen de la parte aérea que los de *Pisolithus tinctorius*.
- En ninguno de los ensayos se han podido establecer morfotipos claramente diferenciados que pudieran ser identificados inequívocamente como *Paxillus involutus* o *Pisolithus tinctorius*. La ausencia de estructuras micorrícicas perfectamente diferenciadas podría ser achacable al corto espacio de tiempo transcurrido entre la siembra y la revisión final. Al mismo tiempo consideramos que la variabilidad morfológica de las micorrizas podría estar en función de la planta huésped de que se trate, lo que habría impedido identificar los morfotipos atendiendo a descripciones ya publicadas, dado que la mayor parte de éstas se basan en plantas huéspedes distintas de *Pinus pinaster*.
- En el cultivo en suelo, la procedencia Noroeste "pino femia", a diferencia que en el cultivo en contenedor, mostró una mayor adaptación que el resto de las procedencias, aunque no presentó claras diferencias respecto al porcentaje de micorrización.
- Las diferencias observadas en la relación longitud / peso seco parte aérea dependieron únicamente del origen de la semilla y fueron independientes del estado micorrícico del sistema radicular.

Se considera interesante la realización de futuras investigaciones en las siguientes direcciones:

- Incrementar el rango de pH estudiado en el caso de *Laccaria laccata*, debido a la preferencia observada por pH altos.

- Investigar la posible relación entre el pH del suelo del micotopo de origen de las cepas y el pH más adecuado para su cultivo *in vitro*, especialmente en el caso de *Boletus badius*.
- Hacer una selección de cepas ectomicorrícicas compatibles con *Pinus pinaster*.
- Realizar un ensayo de mayor duración con el fin de ampliar el estudio actual, dado que el planteamiento y la escasa duración del ensayo no ha permitido detectar diferencias en el segundo año de cultivo, así como el efecto del tratamiento de inoculación, el porcentaje de micorrización o el origen de la semilla sobre el trasplante en campo y su crecimiento posterior.
- Realizar un estudio con el fin de desarrollar un método efectivo de inoculación en vivero en el que se estudiara una mayor variedad de cepas/especies, diferentes tipos de inóculos, métodos y época de inoculación y que fuera fácilmente integrable en el proceso productivo de un vivero comercial.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

Agerer, R. 1991. Ectomycorrhizas of *Sarcodon imbricatus* on Norway spruce and their chlamydospores. Mycorrhiza, 1: 21-30

Agerer, R. 1994. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag. Munich

Agerer, R. y Gronbach, E. 1988. *Cenococcum geophilum*. En: Agerer, R. (ed.). Colour atlas of ectomycorrhizae, plate 27. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd

Aldhous, J. R. 1972. Nursery practice. Forestry Comm. Bull. Nº 43, Londres

Alexander, I. J. 1981. The *Picea sitchensis* + *Lactarius rufus* mycorrhizal association and its effects on seedling growth and development. Trans. Br. Mycol. Soc. 76: 417-423

Alía Miranda, R., Moro Serrano, J. y Denis, J. B. 2001. Ensayos de procedencias de *pinus pinaster* Ait. en el centro de España: resultados a la edad de 32 años. Inv. Agr. Serie Sist. y Rec. For. 10 (2): 333-354

Alía, R. 1989. Mejora genética de *Pinus pinaster* Ait.: Estudio de procedencias. Tesis Doctoral. E.T.S.I. de Montes. Madrid (sin publicar)

Alía, R. y Moro, J. 1996. Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en el centro de España. Invest. Agraria Serie Rec. For

Alía, R. y S. Martín, S. 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Maritime pine (*Pinus pinaster*) International Plant genetic Resources Institute, Roma, Italia, 6 pp

Alía, R., Gil, L. y Pardos, J. A. 1995. Performance of 43 *Pinus pinaster* provenances on 5 locations in Central Spain. Silv. Genet., 44 (2-3): 75-81

Alía, R., Gil, L., Catalán, G. y Pardos, J. A. 1991. Interacción procedencia-edad en 52 procedencias de *Pinus pinaster* Ait. en España. Inv. Agr. Serie Sist. y Rec. For., 0: 11-24

Alía, R., Martín, S., De Miguel, J., Galera, R. M., Agúndez, D., Gordo, J., Salvador, L., Catalán, G. y Gil, L. A. 1996. Regiones de procedencia. *Pinus pinaster* Aiton. Servicio Material Genético, Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Area de Selvicultura y Mejora INIA-CIFOR. Ed. Organismo Autónomo Parques Nacionales. 75 pp. + 29 mapas + 28 fichas

Allen, G. S. 1958. Factors affecting the Viability and Germination Behauviour of Coniferous Seed. For. Chronicle Vol. 34, nº 3: 266-298

Allona, I., Sáiz, J. A., Casado, R. y Aragoncillo, C. 1996. Megagametophyte salt-soluble proteins as genetic markers in *Pinus pinaster* Ait. Silv. Genet. 45 (1): 21-24

Allué Andrade, J. L. 1966. Subregiones fitoclimáticas de España. I.F.I.E. Ed. Minist. Agricultura. Madrid

Allué Andrade, J. L. 1990. Atlas Fitoclimático de España. Taxonomías. INIA. Ministerio de Agricultura, Madrid. 221 pp +8 planos

Alvarado Corrales, E. 1983. El sector forestal en Extremadura. Ecología y Economía. Institución Cultura "El Brocense" de la Excma. Diputación Provincial de Cáceres. Cáceres

Álvarez, I. 1993. Micorrizas. Actas del Congreso Forestal Español. Lourizán (España), V: 137-144

Arduini, I., C. Kettner, D.L. Godbold, A. Onnis & A. Stefani. 1998. pH influence on root morphology and mineral nutrient content of of *Pinus pinaster* seedlings. Plant Biosystems, 132: 3-9

Azevedo, N. 1982. Ectomicorrizas del *Pinus pinaster* Sol. ex Ait. Boletín de la Estación Central de Ecología (ICONA), 11: 37-42

Azul, A. M. y Freitas, H. 1999. Mycorrhizal fungi and their application to forestation programmes with cork oak (*Quercus suber L.*). En: Micorrización en áreas mediterráneas de la Península Ibérica. Junta de Extremadura. Badajoz. Pp. 75-82

Baker, F. S. 1950. Principles of silviculture. McGraw-Hill Book Co., NuevaYork

Bara, S. y Toval, G. 1983. Calidad de estación de *Pinus pinaster* Ait. en Galicia. Comunicaciones INIA. Serie: Recursos Naturales nº 24. INIA. Ministerio de Agricultura. Madrid

Baradat, Ph. 1986. Pin maritime (*Pinus pinaster* Aiton) Rev. For. Fran., 38: 121-124

Baradat, Ph. y Marpeau, A. 1988. Le Pin maritime *Pinus pinaster* Ait.. Biologie el génétique des terpènes pour la conaissance et l'amélioration de l'espèce. Thèse. Université Bordeaux I

Barnett, J. P. 1984. Relating seedling physiology to survival and growth in container-grown southern pines. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster, 157-176

Baxter, J. W., Pickett, S. T. A., Carreiro, M. M. y Dighton, J. 1999. Ectomycorrhizal diversity and community estructure in oak forest stands exposed to contrasting anthropogenic impacts. *Canadian Lournal of Botany*, 77: 771-782

Bellot, F. y Viéitez, E. 1945. Primeros resultados del análisis polínico de las turberas galaicas. Anales de Edafología y Fisiología Vegetal, 2: 280-307

Bellot, F., Barrera, I., Carrasco, M., Fuertes, E. y Velayos, M. 1983. Mapa de la vegetación de la provincia de Cuenca. Excma. Diputación Provincial de Cuenca

Ben Salem, B. 1971. Root strangulation – A neglected factor in container grown nursery stock. H. S. Thesis, Univ. Calif., Berkeley., 50 pp

Bernard Dagan, C., Fillon, C., Pauly, G., Baradat, Ph. y Illy, G. 1971. Les terpènes du pin maritime: aspects biologiques y génétiques. I. variabilité de la composition monoterpenique dans individu, entre individus et entre provenances. Ann. Sci. For., 28 (3): 223-258

Blanco, A. 1986. La degradación del suelo como consecuencia de los incendios. II. Repercusión en los distintos suelos españoles. Montes, 12: 29-33

Boletín Oficial del Estado. 1989. Orden Ministerial del 21-1-89. B.O.E. Nº 33 del 8-2-1989. Madrid

Bonfante-Fasolo, P. y Fontana, A. 1985. VAN fungi in *Ginkgo biloba* roots: Their interactions at cellular level. Symbiosis, 1: 53-67

Bonneau, M., Gelpe, J. Y Illy, G. 1973. Résultats d'essais de fertilization de peuplements adultes de pin maritime. Rev. For. Fran., 25: 539-543

Bouvarel, P. 1960. Note sur la résistance au froid de quelques provenances de Pin maritime. Rev. For. Franc., 7: 495-508

Bowen, G.D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. En ectomycorrhizae: their Ecologi and Physiology. Maarks, G.C. y Kozlowski, T.T. (Eds.) Academic Press, 444 pp

Bradbury, S. M. 1998. Ectomycorrhizas of lodgepole pine (*Pinus contorta*) seedlings originating fron seed in southwestern Alberta cut blocks. *Canadian Journal of Botany*, 76: 213-217

Brandes, B., Godbold, D. L. y Jentschke, G. 1998. Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. New Phytol., 140: 735-744

Branzanti, B. y Zambonelli, A. 1987. Effetti della micorrizazioni sullo sviluppo di semenzali di *Pinus pinaster*. Mic. Ital., 2: 53-57

Braun-Blanquet, J. 1964. Fitosociología. Editorial Blume, 1979. Madrid

Caballero, D. M. 1967. Estudio comparativo de las especies de pinos mexicanos (*Pinus pseudostrobus* Lindl. y *P. montezumae* Lamb.) con base a características de plántula y semilla. INIF. Bol. Téc. Nº. 20

Cailleau, X. 1984. Utilisation el débouchés du pin des Landes. Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France, 70: 1189-1199

Calderón Rodríguez, J. M. 1993. Reseña histórica, geográfica y económica de las funciones del monte en Galicia, en *SegundoIinventarioForestal Nacional (1986-1995). A Coruña, Lugo, Ourense y Pontevedra, ICONA, Madrid, pp. 12-24*

Castellano, M. A. y Molina, R. 1989. Mycorrizae. En: The container tree manual. Landis T. D., Tinus R. W., McDonald, S.E. y Barnett, J.P. (Eds.) For. Serv. U.S.D.A., 101-167

Castellano, M. A. y Trappe, J. M. 1985. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas-fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. Can. J. For. Res. 15: 613-617

Castellano, M.A. 1990. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings: a review. Proc. 8th NACOM, 49 pp

Catalán Bachiller, G. 1991. Semillas de árboles y arbustos forestales. Icona. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 392 pp

Castro Cerceda, M. L., 1985. Macromycetes de pinares gallegos. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Biología. Sin publicar

Ceballos, L. 1933. Sobre la habitación caliza de *Pinus pinaster* Sol. Los pinares de Sierra Almijara. Boletin Soc. Esp. Historia Natural XXXIII, 17-23

Ceballos y Fernández de Córdoba, L. y Ruiz de la Torre, J. 2001. Arboles y arbustos de la España peninsular. Ed. Mundi-Prensa., 512 pp

Cerruti, A. Tozzi, M. y Reitano, G. 1985. Sintesi micorrizica tra *Boletus aereua* e *Castanea sativa*. Allionia, 27: 5-9

Chaperon, H. 1986. La culture du pin maritime en Aquitaine. Ed. AFOCEL (Association Fôret-Cellulose) 231 pp

Chaperon, H., y Cailmail, F. 1988. Regeneration artificielle de la fôret littorale des dunes de Gascogne. Information fôret, 2: 89-99

Chauvin, J.E., Guinberteau, J. y Salesses, G. 1988. Mycorhization in vitro de clones de châtaigniers. Perspectives à la lutte biologìque contre les agents de l´encre et à la production de champignons comestibles. 8e Colloque sur les recherches frutières. Bordeaux (France)

Clement, A., Garbaye, J. Le Tacon, F. 1977. Importance des ectomycorrhizes dans la rèsistance au calcaire du Pin noir (*Pinus nigra* Arn, spp. *Nigricans* Host) Oecol.. Pl., 12: 111-131

Cochran, W. y Cox, G. 1991. Diseños experimentales. Ed. Trillas. México. 661 pp

Cooke, R. C. y Whipps, J.M. 1993. Ecophysiology of fungi. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 337 pp

Costa, M. 1974. Estudio fitosociológico de los matorrales de la provincia de Madrid. Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 31 (1): 225-315

Costa, M. 1988. Unidades de Paisaje vegetal. En Enciclopedia de la Naturaleza del País Valenciano: 135-208

Danjon, F. 1994. Stand features and height growth in a 36 year old maritime pine provenance test. Silvae genetica. 43 (1): 52-62

Davey, C. B. 1984. Nursery soil organic mater: management and importance. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster. 81-86

Day, R. J. 1984. Water management. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster. 93-105

de Bragança, L. y Havel, J. J. 1987. Potential of Pinus pinaster, P. radiata and P. elliottii to rehabilitate dieback sites. Department of Conservation and Land Management, Western Australia, Research Paper 2: 1-11.

De Oliveira, V. L. y Garbaye, J. 1989. Les microorganismes auxiliaines de l'établissement des symbioses ectomycorhiziennes. Eur. J. For. Path. 19: 54-64

de Román, M. y de Miguel, A. M. 2000. Identificación y descripción de las ectomicorrizas de *Quercus ilex* L. subsp. *Ballota* (desf.) Samp. en una zona quemada y una zona sin alterar del carrascal de Nazar (Navarra) Publ. Bio. Univ. Navarra, Ser. Bot., 13-42 pp

Destremau, D. X., Alazard, P. y Chaperon, H. 1982. Monographie génétique de *Pinus pinaster*. Annales forestales, Zagreb. 9/4: 125-150 pp

Díaz Fernández, P., Jiménez, P., Martín, S., De Tuero, M. y Gil, L. 1995. Regiones de procedencia de *Quercus robur* L., *Quercus petraea*(Matt) Liebl y *Quercus humilis* Miller. ICONA, Madrid. 86 pp + 15 fichas

Dixon, R.K., Wright, G. M., Teskey, R.O y Hinckley, T.M. 1980. Water deficits and root growth of ectomycorrhizal white oak seedlings. Can. J. For. Res., 10: 545-548

Duddridge, J.A., Malibari, A. y Read, D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport.nature, 287: 834-836

Duff, G. E. 1928. The varieties and geographical forms of *Pinus pinaster* Sol. in Europe and South Africa. Union of South Africa, British Empire Forester Conference. Pretoria

Duñabeitia, M. K., Hormilla, S., Salcedo, I. y Peña, J. I. 1996. Ectomycorrhizae synthesized between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. Mycologia, 88 (6): 897-908 pp

Duponnois y R., Garbaye J. 1991a. Effect of dual inoculation of douglas-fir with the ectomycorrhizal fungus laccaria-laccata and mycorrhization helper bacteria (mhb) in 2 bare-root forest nurseries. Plant and soil. 138(2): 169-176

Duponnois, R., Garbaye J. 1991b. Mycorrhization helper bacteria associated with the douglas-fir laccaria-laccata symbiosis - effects in aseptic and in glasshouse conditions. Annales des sciences forestieres. 48(3): 239-251

Eavis, B. W. 1972. Soil physical conditions affecting seedling root growth. Plan Soil, 36: 613-622

Fernández de Ana Magán, F., Rodríguez Fernández, A. y Rodríguez Fernández, R. J. 1989. Relación entre a productividade dos fungos micorrícicos e os tratamentos silvícolas en *Pinus pinaster* Ait. VI Xornadas Agrarias Galegas. Sergude. A Coruña

Fernández de Ana Magán, F. y Rodríguez Fernández, A. 2000. Os cogumelos nos ecosistemas forestais galegos. Ed. Xerais. 205 pp

Fernández de Ana Magán, F. 2001. Un Século da evolución da paisaxe forestal na provincia de Pontevedra, axentes patóxenos máis importantes que interviron nesta dinámica entre 1886 e 1986. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (sin publicar)

Fernández, M. 1996. Comportamiento de procedencias de *Pinus pinaster* Ait. con vistas a la selección precoz por su resistencia a la sequía. Tesis Doctoral. ETSIM. Madrid. 253 pp

Fernández Toirán, M. 1994. Estudio de la producción micológica actual en la Comarca de Pinares de Soria y ensayo de técnicas de mejora de la misma. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. 300 pp (sin publicar)

Ferreira dos Santos, N. 1941. Elementos para o estudio das micorrizas ectendotróficas do *Pinus pinaster* Sol.. Publ. Serv. Florestais Agric. Portugal, 8: 65-95

Ferri, F. 1985. I funghi. Micologia, isolamento, cultivazione. Ed, Edagricole (Bologna-Italia) 398 pp

Fieschi V. y Gaussen H. 1932. La classification des Pins maritimes. Trab. Lab. Fores. Toulouse. Tome I. Vol. I. Art. 19

Founoune, H., Duponnois, R., Bâ, A. M., Sall, S., Branget, I., Lorquin, J., Neyra, M. y Chotte, J. L. 2002. Mycorrhiza Helper Bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. New Phytologist. Vol. 153, Nº 1: 81 pp

Franco, J. 1986. Pinus. En Flora Iberica. Real Jardín Botánico. CSIC. Madrid. Vol. 1, 168-174

Fraser, J. W. 1970. Cardinal temperatures for germination of white, red and jack pine seed. Petawawa Forest Experiment Station. Information report PS-X-15, Ontario, Canada

Fries, N. 1978. Basidiospore germination in some mycorrhiza-forming hymenimy*cetes*. Trans.Br. Myvol. Soc, 70: 319-324.

Fynlay, R.D. y Read, D. J. 1986a. The structure and function of the vegetative mycellium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of ^{14}C-labelled carbon between plants inteconnected by a common mycelium. New Phytol., 103: 143-156.

Fynlay, R.D. y Read, D. J. 1986b. The structure and function of the vegetative mycellium of ectomycorrhizal plants. I. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. New Phytol. , 103: 143-156.

Garbaye, J. 1991. Biological interactions in the mycorrhizosphere. Experientia 47: 370-375.

Garbaye, J. y Bowen, G. D. 1987. Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata.*Can. J. For. Res. 17: 941–943

Garbaye, J. y Bowen, G. D. 1989. Stimulation of mycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. New Phytologist. 122: 383-388.

Garbaye, J., Churin, J. y Duponnois, R. 1992. Effects of substrate sterilization, fungicide treatment, and mycorrhization helper bacteria on ectomycorrhizal formation of pedunculate oak (*Quercus robur*) inoculated with *Laccaria laccata* in two peat bare-root nurseries. Biol. Fertil. Soils. 13: 55-57

Gautry, J. Y, Jouvenceau, S. y Thivolle-cazat, A. 1991. Mycorhization artificielle du Douglas et de l'épicéa et interaction clone x champignon. Class. Oxford: 181-351, 181-36

Gelpe, J. y Guinadeau, J. 1974. Essai de fertilization minérale sur pins maritimes a Mimizan (Landes), rèsultats après la 18º annes. Rev. For. Fran., 26: 459-463

Gil, L., Gordo, J., Alía, R., Catalán, G., y Pardos, J.A. 1990. *Pinus pinaster* Ait. en el paisaje vegetal de la Península Ibérica. Ecología. Fuera de serie nº 1. 469-495

Giraud, M. 1988. Prélèvement et analyse de mycorhizes. En: CTIFL (Ed.), La truffe, FNPT 10, Congrès de la trufficulture, Saintes, 27-28 novembre 1987, 49-63

González Garcés, M. 1987. Historia de la Coruña: Edad Media, La Coruña, Caixa Galicia, 707 pp.

González Ochoa, A. I. 2004. Manejo de regenerados naturales post-incendio y regeneración artificial con planta micorrizada en el SE de España. Ecosistemas, nº 1

González Ochoa, A. I., de las Heras, J., Torres, P. y Sánchez Gómez, E. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. Ann. For. Sci., 60: 43-48

Goor, A. Y. y Barney, C. N. 1968. Forest tree planting in arid zones. Ronald Press Co. New York

Gracia, E., Martínez, O., Barceló, M. y Ximeno, F. 1993. Test de micorrización para pinos productores de níscalos. Análisis cualitativo. Actas del Congreso Forestal Español. Pontevedra (España) III: 369-373

Graham, J.H. y Linderman, P. D. 1980., Ethylene production by ectomycirrhizal fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini* and by aseptically synthesized ectomycorrhizae and *Fusarium* infected Douglas-fir root. Can. J. Microbiol., 26: 1340-1347

Guinadeau, J. 1956. Nord-ouest de l'Espagne: aperçu de quelques problems forestieres. Rev. For. Fran. 8: 813-825

Guyon, J. P. y Kremer, A. 1982. Stabilité phénotipique de la croissance en hauteur et cinétique journaliere de la pression de séve et de la transpiration chex le Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) Can. J. For. Res. 12: 936-946

Harfouche, A., Baradat, Ph. y Durel, C. E. 1995a. Variabilité intráspecifique chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) dans le sud-est de la France. I. Variabilité des populations autochtones et des populations de l'esemble de l'aire de l'espece. Ann. Sci. For. 52: 307-328

Harfouche, A., Baradat, Ph. y Kremer, A. 1995b. Variabilité intráspecifique chez le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) dans le sud-est de la France. II. Hétérosis et combinaison de caractéres chez des hybrides interraciaux. Ann. Sci. For. 52: 329-346

Harley, J. E. y Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London, 483 pp

Hayman, D. S. y Mosse, B. 1972. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Inceased uptake of labile p from soil. New Phytol.,71: 41-47

Hermann, R. K. 1977. Growth and production of tree roots. Range Sci. Dep. Sci. Ser. No. 26, Colorado State Univ. Fort Collins, 7-28.

Hiatt, N. A. y Tinus, R. W. 1974. Container shape controls root system configuration of ponderosa pine. Proc. North. Am. Containerized For. Tree Seedling Symp. Great Plains Agric. Counc., Publ. 68: 194-196

Hopfner, H. 1954. La evolución de los bosques de Castilla la Vieja en tiempos históricos. Estudios geográficos, 54: 415-430.

Huguet del Villar H. 1933. Sobre el hábitat calizo del *Pinus pinaster*. Boletín Soc. Española Historia Natural XXXIII, 133-138.

Illy, G. 1966. Recherches sur l'ameloration génétique du Pin maritime. Ann. Sci. Forest., 23: 757-948

Iqbal, S. H., Yousaf, M y Younus, M. 1981. A field survey of micorrhyzal associations in ferns of Pakistan. New Phytol., 87: 69-79

Izco, J. 1984. Madrid Verde. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación-Comunidad de Madrid. Madrid

Jentschke, G., B. Brandes, A. J. Kuhn, W. H. Schröder y D. L. Godbold. 2001. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytol., 149: 327-337

Jordán González, E., Monreal Montoya, J. A. y Casamayor Torrijos, M. C. 2003. Influencia de la resinación en el crecimiento en altura y la esbeltez del *pino pinaster* en Sotos (Cuenca) Montes Ciencia y Técnica, Nº 72

Kintgh, R. G. 1949. Some effects of temperature on germination and development of pinyon pine. Jopurnal of Forestry 47: 622-626

Koller, D., Mayer, A. M., Polkakoff-Mayber, A. y Kein, S. 1962. Seed germination. Ann. Rev. of Plant Physiol., 13: 437-464

Kozlowski, T. T. 1971. Seed germination, ontogeny, and shoot growth. In: Growth and development of trees. Academic Press, N.Y.

Kropp, B. R. y Langlois, C. G. 1990. Ectomycorrhizae in reforetation. Can. J. For. Res., 20: 438-451.

Krupa, S. y Fries, N. 1971. Studies on ectomycorrhizae of pine. I Production of volatile organic compounds. Can. J. Bot., 49: 1425-1431.

Laguna, E. 1988. Respuesta y adaptación de la vegetación al fuego. En: S. REYNA (dir.) Los Incendios Forestales en la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Valencia: 49-55

Lahio, O. 1970. *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. Acta. For. Fenn., 106: 1-65

Landis, T. D. 1984. Irrigation water quality in tree nurseries in the inland west. Proc. Intermountain Nursery-men's Assoc. Meeting, Edmonton, Alberta, Can., 60-67

Last, F. T., Mason, P. A., Pelham, J. y Ingleby, K. 1984. Fritbody production by sheathing mycorrhizal fungi: effects of "host" genotypes and propagating soils. Forest Ecology and Management, 9: 221-227

Lee, K. J. y Koo, C. D. 1992. Results of ectomycorrhizal inoculation of pine species with *Pisolithus tinctorius* and *Telephora terrestris* in Korea. En Mycorrhizas in ecosystems. C.A.B. International. U. K.

Le Tacon, F. Bouchard, D. 1986. Effect of different ectomycorrhizal fungi of growth of Larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. Acta Oecol. Oecol. Appl. 7: 389-402

Le Tacon, F., Alvarez, I. F., Bouchard, D., Henrion, B., Jackson, R. M., Luff, S., Parlade, J. I., Pera, J., Stentröm, E., Villeneuve, N. y Walker, C. 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. En Mycorrhizas in ecosystems. C.A.B. International. U. K.

Linderman, R. G. 1988. Mycorrhizal interations with the rizosphere microflora: the mycorrhizosphere effects. Phytophatology, 78: 336-371.

Loustau, D., y El-Hadj Moussa, F. 1989. Variability of stomatal conductance in the crown of a maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) Ann. Sci. For., 46 (suppl.): 426s-428s.

Malajczuk, N. y McComb, A. J. 1977. Root exudates from Keucalyptus calophylla R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn. ex. Sm and their effects on *Phytophora cinnamoni* Rands. Aust. J. Bot., 25: 501-514

Malajczuk, N., Lapeyrie F. y Garbaye J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. I. Mycorrhizal formation in model systems. New Phytol., 114: 627-631

Malajczuk, N., Molina, R. y Trappe, J. 1982. Ectomycorrhizal formation in *Eucalytus*. I. Pure culture synthesis, host specifity and mycorrizal compatibility with *Pinus radiata*. New Phytologist., 91: 467-482

March E. K. 1939. Review of Fieschi (1932) and Fieschi et Gaussen (1932) above. Jour. S. A. For. Asoc. Nº 3

Mariette, S., Chagné, D., Lézier, C., Pastuszka, P., Raffin, A., Plomion, C. y Kremer, A. 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. Heredity, 86: 469-479

Maronek, M., Hendrix, J. M. y Kiernan, J. 1981. Mycorrhizal fungii and their importance in horticultural crop production. Horticultural Reviews., 3: 172-213.

Marshall, J.D. 1986. Drought and shade interact to cause fine root mortality in Douglash-fir seedlings. Plant Soil., 91: 51-60

Martín Bolaños, M. y Vicioso, C. 1956. Estudio de razas y variedades en los pinos españoles. Anales IFIE., 1: 13-24

Martín Bolaños, M. y Vicioso, C. 1957. Estudio de razas y variedades en los pinos españoles. Anales IFIE. 2: 9-15

Marx, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistence of pine roots to pathogenic infections: I Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology.,59: 153-163

Marx, D. H. 1972. Ectomycorrizae as biological deterrents to pathogenic root infections. Phytopathology., 10: 429-454

Marx, D. H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases. En Ectomycorrhizae: their Ecology and Phisiology. Marks, G.C. y Kozlowsky, T.T. (Eds) Academic Prexx New York., 444 pp

Marx, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. Tropical mycorrhiza research. Oxford Univers. Press. New York, 13-71

Marx, D. H. 1981. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctotius* as affected by surce, age, and reisolation. Can. J. For. Res., 11: 168-174

Marx, D. H. y Kenney, D. S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. Methods and Principles of Mycorrhizaal Research. Schenk, N. C. (Ed) Am. Phytopatol. Soc., St. Paul, MN., pp.: 131-146

Marx, D. H., Bryam, W. C. y Davy, C. B. 1970. Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. For. Sci., 16: 424-431

Marx, D. H., Ruehle, J. L., Cordell, C. E. 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomhycorrhiza. Methods in microbiology. Vol. 23. Academic Press. London. 384-411

Matziris, D. I. 1982. Variation in growth and quality characters in *Pinus pinaster* provenances grown al seven sites in Greece. Silvae Genetica 31: 168-173

Maugè, J. P. 1973. Fertilization et croissance du pin maritime dans la région landaise. Annales Afocel 1972, 141-175 pp

Maugè, J. P. 1974. Fertilization minérale et developpement racinaire du pin maritime. Annales Afocel 1973, 57-87 pp

Maugè, J. P. 1987. Le pin maritime. Ed. Institut pour le developpment Forestier (idf) 192 pp

Mayer, A. M. y Shain, Y. 1974. Control of seed germination. Ann. Rev. of Plant Physiol. 25: 167-193

McLemore, B. F. 1959. Cone maturity affects germination of longleaf pine seed. Journal of Forestry, 57: 648-650

Melin, E. y Rama Das, V. S. 1954. Influence of root-metabolities on the growth of tree mycorrhizal fungi. Phisiol. Plant, 7: 851-858

Meyer, F. H. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forest. En: Ectomycorrhizae: their ecology and phisiologi. Marks, G. C. y Kozlowski, T. T. (Eds.) Academic Press. New York., 79-105

Miller, C. O. 1971. Cytokinin production by mycorrhizal fungi. En: Mycorrhizae. Hacskaylo, E. (Ed), USDA, Forest, Serv. Misc. Publ., 1189: 168-174

Miller, S. L., Koo, C. D. y Molina, R. 1991. Characterization of red alder ectomycorrhizae: a preface to monitoring belowground ecological responses. Can. J. Bot. 69: 516-531

Mirov, N. T. 1967. The genus *Pinus*. The Ronald Press Co. New York., 602 pp

Modess, O. 1941. Zur kenntnis der mycorrhizal von Kiefer und Fichte. Symb. Bot. Upsal., 5: 1-146.

Molina Rodríguez, F. 1965. Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el Noroeste de España. ANALES del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, 10: 221-238. Madrid

Molina Rodríguez, F. 1979. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lodgepole seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. Forest Sci., 25: 585-590

Molina Ibáñez, M. y López Estebaranz, M. 2004. Hacia un modelo de puesta de valor y gestión sostenible de la micología: Presentación del proyecto life – medio ambiente MYAS: "micología y aprovechamiento sostenible". A Pantorra, 4: 5-14

Molina, R. y Palmer, J. G. 1982. Insolation, maintenance and culture manipulation of ectomicorrhizal fungi. En:. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Schenk, N.C. (ed), Am. Phytopatol. Soc. St. Paul., 115-129 pp

Molina, R. y Trappe, J. M. 1982. Lack of mycorrhizal specifity by the ericaceous host *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. New Phytol., 90: 495-509.

Molina, S. F. 1965. Comportamiento racial del *Pinus pinaster* en el Noroeste de España. Anales IFIE 2(10): 221-238

Moore, R. 1988. Aspects of agroforestry research in Western Australia. En The International Forestry Conference for the Australian Bicentenary 1988: Proceedings of Papers Contributed and/or Presented and Histories of Australian Forestry and Forest Products Institutions and Associations. Albury-Wodonga, 25th April-1st May 1988. Volume II of V (Ed. R.L. Newman) Australian Forest Development Institute, Canberra., 1-9 pp

Morby, F. E. 1984. Nursery-site selection , layout and development. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster, 9-15

Morton, J. B. y Benny, G. L. 1990. Revised clasification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. Mycotaxon, 37: 471-491

Mousain, D., Couteaudier, Y. y Pierson, J. 1976. Synthèses de mycorhizes du *Lactarius deliciosus* chez le *Pinus pinaster.* Ann. Phytopathol., 11: 130

Mousain, D., Delmas, J. y Poitou, N. 1977. Influences of the ectomycorrhizae of *Hebelomacylindrosporum* and *Pisolithus tinctorius* on the growth of young cluster pine. Proc. Third N.A.C.O.N., 94 pp

Mousain, D., Poitou, N. y Delmas, J. 1979. La symbiose mycorhizienne: resultats obtenus avec l'*Hebeloma cylindrosporum* et le *Pisolithus tinctorius*, et perspectives d'application agronomique. Mushroom Sci., 10: 949-956

Navarro, F., Valle, C. J. 1987. Castilla-León. En La Vegetación de España (editores: M. Peinado Lorca y S. Rivas Martínez) Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares: 117-162

Nguyen, A. 1986. Effets d'un contrainte hydrique racinaire sur de jeunes plants du Pin maritime. Thèse. Université Bordeaux I: 149 pp

Nguyen, A. y Lamant, A. 1989. Variation in growth and osmotic regulation of roots of water-stressed maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) provenances. Tree physiology., 5 (1): 123-133

Nicholls, J. N. P., Dadswell, H. E. y Perry, P. H. 1963. Assesment of wood qualities for tree breedimg II in *Pinus pinaster* Ait. from Western Australia, Silvae Genetica., 12: 105-110

Nicolás, A. y Gandullo, J. M. 1967. Ecología de los pinares españoles I: *Pinus pinaster* Aiton. I.F.I.E. Madrid. 310 pp

Niembro Rocas, A. 1986. Mecanismo de reproducción sexual en pinos. Ed. Limusa, S.A. de C.V., México, 130 pp

Otha, S., Keller, R. y Janin, G. 1985. Effets de divers modes de fertilization (N. P. K.) sur certaines caractéristiques physiques, chimiques, mécaniques et propriétés papetiéres du pin maritime des Landes (*Pinus pinaster* Ait.) Ann. Sci. Forest., 42: 69-96

Palmer, J. G. y Hackaylo, E. 1970. Ectomycorrhizal fungi in pure culture. I. Growth on single carbon sources. Physiol. Plant., 23: 1187-1197

Peinado Lorca, M. y Martínez Parras, J. M. 1985. El paisaje vegetal de Castilla-La Mancha. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Toledo

Peñuelas Rubira, J. y Ocaña Bueno, L. 2000. Cultivo de plantas forestales en contenedor. Principios y fundamentos. Ministerio de agricultura Pesca y Alimentación. Madrid., 190 pp

Pera i Alvarez, J. 1993. Selección de hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* Ait. para su aplicación en reforestación. Tesis Doctoral.

Pera, J. y Alvarez, I. F. 1995. Ectomycorrhizal fungi of pinus-pinaster. Mycorrhiza 5: 193-200

Pera, J., Parlade, J., y Álvarez, I.F. 1994. Eficacia del tipo de inóculo de *Pisolithus tinctorius* en la formación de micorrizas en *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii*. Invest. Agrar. Sist. Recur. For. Vol. 3

Pera, J., Parlade, J., y Álvarez, I.F. 1998. Eficacia del inóculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la micorrización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*. Invest. Agrar. Sist. Recur. For. Vol 7 (1 y 2)

Perry, D. H. 1949. Pinus pinaster in Western Australia: some notes on the geographical forms, en *Molina Rodríguez, F. 1965. Comportamiento racial del Pinus pinaster en el Noroeste de España. ANALES del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, 10: 221-238. Madrid*

Perry, D. H., Molina, R. y Amaranthus, M. P. 1987. Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: current knowledge and research needs. Can. J. For. Res., 17: 929-940

Petit, R. J. 1988. Ressources genetiques du Pin maritime: Apport des marqueurs enzymatiques. Diplome d'etudes approfondies. Université de Paris Sud-Orssay: 106 pp

Petit, R. J., Bahrman, N. y Baradat, Ph. 1995. Comparison of genetic differentiation in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) estimated using isozyme, total protein and terpenic loci. Heredity. 75: 382-389

Pillukat, A. 1992. Comparison of the ectomycorrhizas formed by *Russula ochroleuca* on several tree species. En Mycorrhizas in Ecosystems. C.A.B. International. U. K.

Pinto da Silva, A. R. 1947. Sobre a sistematica dos pinheiros bravos portugueses. Broteria. Ciencias Naturais. 16 (I-II): 60-75

Plassard, C., Bonafos, B. y Touraine, B. 2004. Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth an N utilization in *Pinus pinaster*. Plant, Cell & Environment. Vol. 23, nº 11: 1195-1205

Poitou, N., Mamoun, M. y Delmas, J. 1982. Quelques résultats obtenus concernant la mycorhization de plantes-hôtes par les champignons mycorhiziens comestibles. Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. y Trouvelot, A. (Eds.) Les Mycorrhizes: biologie et utilization. Les colloques de l'INRA, nº 13: 295-301

Poitou, N., Mamoun, M., Ducamp, M. y Delmas, J. 1983. Prémiers résultats de fructification *in situ* d'un bolet mycorhizien comestible en conditions contrôlées et espérance pour la culture des cépes nobles. Révue Horticole, 239: 45-47

Poitou, N., Mamoun, M., Ducamp, M. y Delmas, J. 1984., Après le bolet granuleux le *Lactarius deliciosus* obtenue en fructification au champ à partir de plants mycorrhizés. Revue Horticole, 244: 65-67

Pollock, B. M. y Ross, E. E. 1972. Seed and seedling vigor. En: T. T. Kozlowski, Ed. Seed Biology, Vol. I. Academic Press, N.Y.

Prada, M. A., Allué, M., Gil, L. y Pardos, J. A. 1997. Programa de mejora genética de *pinus pinaster* Ait. grandes productores de Miera en la provincia de Segovia. Cuadernos de la SECF. 5, 67-71

Rabain, S. C. 1980. The ocurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus tenuis with moss *Fumaria hygrometrica*. Mycologia, 72 (1): 191-195

Rabatin, S. C. 1980. The ocurrence of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus tenuis* with moss *Fumaria hygrometrica*, Mycologia, 72 (1): 191-195

Raper, J. R. y Raper, C. A., 1972. Life cycle and prospects of interstrain breeding in *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci. 8: 1-19

Rehder, A. 1940. Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America. 2ª Ed. The McMillan Co., New York, 996 pp

Resch, T. 1974. Essai de distinction des races majeurs de *Pinus pinaster*. Annales de la recherche forestière au Maroc. 14: 91-102

Rikly, M. 1943. Das Pfanzenkleid der Mittelmeerländer. Vol. I. Huber. Vern.

Ritchie, G. A. 1984. Assessing seedling quality. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster., 243-259 pp

Rivas Martínez, S. 1975. Mapa de vegetación de la provincia de Ávila. Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 32 (2): 1493-1556

Rivas Martínez, S. 1987. Memoria del mapa de series de vegetación de España. ICONA. Madrid

Rodríguez Fernández, A. 1992. Estudio de la variabilidad de un hongo ectomicorrícico de *Castanea spp.*: *Boletus fragrans* Vitt. Nova Acta Científica Compostelana

Rodríguez Fernández, A. 1995. Estudio fenológico, productivo y técnicas de micorrización de un hongo ectomicorrícico, *Boletus fragrans* Vittad., en *Castanea. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Biología (sin publicar)*

Rodríguez Soalleiro, R., Alvarez González, J. G., Cela González, M., Mansilla Vázquez, P., Vega Alonso, P., González Rosales, M., Ruiz Zorrilla, P., Vega Alonso, G., Castillón Palomeque, P., Alvarez Alvarez, P., Rigueiro Rodríguez, P. 1997. Manual técnico de selvicultura del Pino pinaster. Proxecto Columella. Area Forestal. Serie Manuales Técnicos. Universidade de Santiago de Compostela. Ed. KRK Ediciones. Oviedo. 75 pp

Rol, R. 1933. Les races françaises de Pin maritime, en *Molina Rodríguez, F. 1965. Comportamiento racial del Pinus pinaster en el Noroeste de España. ANALES del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, 10: 221-238. Madrid*

Rovira, A.D., y Bowen, G.D. 1966. The effects of micro-organisms upon plant growth: II. Detoxication of heat-sterilized soils by fungi and bacteria. Plant Soil, 25:129–142

Ruano Martínez, J. R. 2003. Viveros forestales. Manual de cultivo y proyectos. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 281 pp

Ruehle, J. L., Marx, D. H., Aborough, N. 1981. Development of *Pisolithus tinctorius* and *Telephora terrestris* ectomycorrhizas on seedlings of coniferous trees important to Marocco. Ann. Resch. For. Maroc., 21: 283-296

Ruiz Zorrilla, P. 1980. Notas para la historia del pino en Galicia. El Monte en Galicia. Fuentes para su estudio. Ministerio de Cultura. Madrid. 171-195

Rycroft, H. B. y Wicht, C. L. 1947. Field trials of geographical races of *Pinus pinaster* in South Africa. Rr. Emp. For. Conj. Great Britain. Pretoria, South Africa.

Salvador, L., Seisdedos, M., Alía, R. y Gil, L. 1996. Variabilidad genética de las poblaciones natutrales de *Pinus pinaster* en la península ibérica. Cuadernos de la SECF

Sánchez Mata, D. 1986. Estudio de la flora y vegetación del macizo oriental de la Sierra de Gredos. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense. Madrid

Sánchez Mata, D. y Fernández González, F. 1989. Bosques actuales. En El libro Rojo de los Bosques españoles. Coord.: C. Ortega9. ADENA-WWWF España: 67-108

Sanz Fernández, J. 1986. La historia contemporánea de los montes públicos españoles, 1812-1930. Notas y reflexiones II. En Historia Contemporánea 3. El fin de la agricultura tradicional (1900-1960. Garrabou, R., Barciella, C. Y Jiménez Blanco, J. (Eds.), Barcelona, Crítica: 142-170

Sarrauste, M. 1982. Photosinthèse, respiration et répartition de la matière sèche de jeunes plants de Pin maritime appartenant à 7 provenances et conduits selon 2 traitements hydri ques. Mémoire de D.E.A. Université Pierre et Marie Curie, París VI

SAS Institute 1990. SAS/STAT User's Guide, version 6. 4ª ed. SAS Institute Inc., Cary, NC

Scannerini, S. y Bonfante-Fasolo, P. 1983. Comparative ultraestructural analysis of mycorrhizal associations. Can. J. Bot., 61:917-943

Schafer, G. H. 1988. A site growth model for *Pinus pinaster* in the Southern Cape. South Africa Forestry Journal, 146: 12-22

Schramm, J. R. 1966. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pennsylvania. Trans. Am. Philos. Soc., 56: 194 pp

Schübler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycol. Res., 105 (12): 1413-1421

Schvester, D. 1982. Incidences de Matsucoccus feytaudi Duc. Sur Pins maritimes de diverses provenances (*Pinus pinaster* Ait.) en région mediterranéenne. Académie d'Agriculture de France., 1324-1333

Scott, C. W. 1962. A summary of information of *Pinus pinaster* Ait. For. Abs., 23 (1 y 2)

Shemakhanova, N. M. 1962. Mycitrophy of woody plants. En: Academy of sciences of the URSS Institute of Microbiology. Trad. "Israel program for Scientific Translations". Jerusalén, 329 pp

Sierra de Grado, R. 1993. Mejora genética de *Pinus pinaster* Aiton de la procedencia Sierra de Gredos. Caracteres de crecimiento y forma. Tesis Doctoral. ETSIM. Madrid. 191 pp

Sierra de Grado, R. 1996. ¿Es el *Pinus pinaster* espontáneo en la Sierra de Gredos? Montes Divulgación. Nº 43:5-8

Slankis, V. 1973. Hormonal relationships in mycirrhizal development. En: Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology. Marks, g. C. y Kozlowski, T.T. (eds) Academic Press New York, 444 pp

Stein, W. J. 1974. Improving containerized reforestation systems. Proc. North Am. Containerized For. Tree seedling Symp., Great Plains Agric. Counc. Publ. 68, pp 434-440

Strullu, D. G., Grellier, B, Marciniak, D. y Letoze, R. 1986. Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal synthesis in vitro. New Phytol., 102: 95-101

Strullu, D. G., Harley, J. M., Gourret, J. P. y Garrec, J. P. 1983. Ultrastructure and microanalysis of the polyphosphate granules of ectomycirrhizas of *Fagus sylvatica*. New Phytol.,92: 417-423

Sweet, G. B. y Thulin, I. J. 1962. Provenance of *Pinus pinaster* Ait. A five year progress report on a trial at Woodhill, New Zealand. New Zeal. J. Forestry 8 (4): 570-586

Taborda de Morais, A. 1940. Novas áreas de fitogeografía portuguesa. Boletim da Sociedade Broteriana, vol. XIV, Nº 19: 97-138

Tadesse, W., Auñón, F. J., Prada, A., Nanos, N., Allué, M., Pardos, J. A., Gil, L. y Alía, R. 1999. Mejora genética de *Pinus pinaster* Ait. grandes productores de miera en la Meseta Castellana. Montes Ciencia y Técnica, Nº 58: 67-73

Takacs, E. A. 1961. Inoculación de especies de pinos con hongos formadores de micorrizas. Silvicultura, 15: 5-17

Teixeira, C. 1944. Subsidios para a historia evolutiva do pinheiro dentro da flora portuguesa. Boletin da sociedade Broteriana. 19 (2ª serie), 1ª part. 209-221

Tepper, H. B. 1964. Ontogeny of the shoot apex of seedlings of *Pinus ponderosa*. Amer. J. of Bot. 51: 859-865

The Royal Horticultural Society 1995. RHS Colour Chart. The Royal Horticultural Society, London

Thivolle-Cazat, A. 1987. Les mycorrhizes. Intérêt en pèpiniér et forêt. Afocel Armef Infor. For., 3 (322)

Thornwaite, C. W. 1948. An approach toward a rational classification of climate. Geog. Rev. 38: 55-94

Tinus, R. W. y Owston, P. W. 1984. Physiology research made forestation with container-grown seedlings successfull. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster, 143-155 pp

Toole, E. H., Hendricks, S. B., Borthwick, H. A. y Toole, V. K. 1956. Physiology of seed germination. Ann. Rev. of Plant Physiol. 7: 299-324

Torres, P. y Honrubia, M.1997. Changes and effects of a natural fire on ectomycorrhizal inoculum potential of soil in a *Pinus halepensis* forest. *Forest Ecology and Management*, 96: 189-196

Torres, P. y Honrubia, M. 1991. Basidiospore viability in stored slurries. Mycol Res., 98 (5): 527-530

Torres, P. y Honrubia, M. 1991. Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo. Cryptogamie Mycol. 12 (3): 183-192

Toval, G. 1987. Zonificación de áreas de semillas y reproducción. Ensayos de procedencias, 8 pgs. + 9 mapas. Lourizán (sin publicar)

Tozzi, M., Ceruti Scurti, J., Berta, G. 1980. Richerche preliminari di sintesi tra *Boletus edulis* e *Quercus pubescens*. Allionia, 24, 5

Trappe, J. M. 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae with species of *Hebeloma, Suillus, Rhizopogon* and *Astraeus*. For. Sci., 13: 121-130

Trappe, J. M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Ann. Rev. Phytopathol. 15: 203-222

Trappe, J. M. y Fogel, R. D. 1977. Ecosystematic functions of mycorrhizae. En: The belowground ecosystem: a synthesis of plant-associated processes. Marshall, J. K. (ed), Range Sci. Dep. Sci. Ser. No. 26, Colorado Satate Univ. Fort Collins, pp. 205-214

Trappe, J. M. y Schenck, N. C. 1984. Taxonomy of the fungi formig endomycorrhizae. A. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonales) En: Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Schenk, N. C. (ed), Am. Phytopatol. Soc.St..Paul, M.N., 1-9 pp

Trappe, J. M., Molina, R. y Castellano, M. 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. Annu. Rev. Phytopathol. 22: 331-359

Trotymov, J. A. 1990. A review of outplanting trials with ectomycorrhizal conifer seedlings. Proc. 8th NACOM, 289 pp

Tutin, T. G. y Heywood, H. H. 1964. Flora Europaea. Cambridge University Press

Ulrich, J. M. 1960. Auxin production by mycorrhizal fungi. Physiologia Pl., 13: 429-443

Manuel, C. M. y Gil, L. 2002. Tercer Inventario Forestal Nacional, 1997-2006. La transformación histórica del paisaje forestal en Galicia. Ministerio de Medio Ambiente. 159 pp

Velasco, F. 1975. Estado actual de las investigaciones sobre la influencia de la vegetación en los diversos procesos edáficos. Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 32 (2): 1131-1152

Velasco, F. y López Martínez, T. 1973. Repercusiones físicas de la alteración del equilibrio biológico en diversos suelos españoles. An. Edaf. y Agrob., 32 (7-8): 647-661

Villanueva, J., Díaz, R., Sandoval., V., Collado, A., Gómez, A., López, F., González, M. C., Villaescusa, R., Vallejo, R., Pascual, T. y Piñeiro, J. 2002. Tercer Inventario Forestal Nacional, 1997-2006. Galicia. A Coruña. Ministerio de Medio Ambiente. 314 pp

Villanueva, J., Díaz, R., Sandoval., V., Collado, A., Gómez, A., López, F., González, M. C., Villaescusa, R., Vallejo, R., Pascual, T. y Piñeiro, J. 2002. Tercer Inventario Forestal Nacional, 1997-2006. Galicia. Lugo. Ministerio de Medio Ambiente. 314 pp

Villanueva, J., Díaz, R., Sandoval., V., Collado, A., Gómez, A., López, F., González, M. C., Villaescusa, R., Vallejo, R., Pascual, T. y Piñeiro, J. 2002. Tercer Inventario Forestal Nacional, 1997-2006. Galicia. Ourense. Ministerio de Medio Ambiente. 314 pp

Villanueva, J., Díaz, R., Sandoval., V., Collado, A., Gómez, A., López, F., González, M. C., Villaescusa, R., Vallejo, R., Pascual, T. y Piñeiro, J. 2002. Tercer Inventario Forestal Nacional, 1997-2006. Galicia. Pontevedra. Ministerio de Medio Ambiente. 314 pp

Waring, R. E. y Schlesinger, W. H. 1985. Forest Ecosystems. Ed. Academic Press, Inc. Florida

Warkentin, B. P. 1984. Physical properties of forest – nursery soils: relation to seedling growth. Duryea, H. L. y Landis, T. D. (Eds.) Forest nursery manual: production of barerrot seedlings. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague/Boston/Lancaster, 53-61 pp

Willan, R. L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos. FAO, Roma, 502 pp

Wright, E. y Ching, K. K. 1962. Effect of Seed Source on Mycorrhizal Formation on Douglas Fir Seedlings. Northwest Science. Vol. 36, Nº. 1: 1-6

Zak, B. y Marx, D. H. 1964. Insolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines. For. Sci., 10: 214-222

Zuccherelli, G. 1988. Prime esperienze sulla produzione di piante forestali micorrizate co *Boletus edulis*. Monti e Boschi, 3: 11-14