

Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*

J. A. Domínguez Núñez^{1*}, R. Planelles², J. A. Rodríguez Barreal¹
y J. A. Saiz de Omeñaca¹

¹ U.D. Patología Forestal. Departamento de Silvopascicultura. ETS Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

Avda. Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid. Spain

² INIA. Departamento de Medio Ambiente. Apdo. 8111. 28080 Madrid. Spain

Resumen

Se ha estudiado la influencia de la micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt. en la calidad de plántula de *Pinus halepensis* Mill. durante los meses de junio a noviembre en el primer año de cultivo en vivero. La micorrización incrementó la altura, diámetro, pesos aéreo y radical, y el número de ápices radicales. En planta micorrizada la concentración de fósforo total fue mayor que en la no micorrizada; sin embargo la micorrización hizo disminuir la concentración de calcio. En situación de disponibilidad hídrica, no está clara la influencia de la micorrización en el potencial hídrico de la planta, aunque la tasa de fotosíntesis y transpiración fueron incrementadas en algún momento.

Palabras clave: ectomicorrizas, *Pinus halepensis*, *Tuber melanosporum*, vivero, crecimiento, nutrientes, intercambio gaseoso.

Abstract

The influence of the mycorrhization with black truffle in growth, gas exchange and mineral nutrition of *Pinus halepensis*

Influence of *Tuber melanosporum* Vitt mycorrhization in plant quality of *Pinus halepensis* Mill. was assessed from June to November during first nursery year. Seedlings were regularly watered. Mycorrhization causes increment in height, diameter, root and aerial weights, and number of root shoots induced. Mycorrhized plants showed both higher phosphorous and lower calcium concentration levels. Under water availability, influence of mycorrhization on water potential of the plant is not well defined, although both photosynthetic and transpiration rates occasionally increased.

Key words: ectomycorrhiza, *Pinus halepensis*, *Tuber melanosporum*, nursery, physiology, growth, gas exchange, nutrient.

Introducción

Las hifas de los hongos micorrícicos incrementan el volumen de suelo explorado, accediendo a nutrientes como el fósforo disponible que son absorbidos y suministrados a las raíces de la planta huésped (Harley & Smith, 1983). En materia orgánica en descomposición, las hifas de hongos ectomicorrícicos pueden acceder a fuentes de nutrientes del suelo de forma más eficiente que las raíces de la planta huésped (Harvey *et al.*, 1976; Reddell & Malajczuk, 1984; Bending & Read, 1995). En la bibliografía hay evidencias de que

estas asociaciones simbióticas tienen un gran beneficio para la nutrición de la planta cuando el fósforo del suelo está presente en formas poco solubles (Bolan, 1991; Schweiger, 1994; Tarafdar & Marschner, 1994). Las hifas de hongos ectomicorrícicos pueden utilizar tanto fuentes orgánicas como inorgánicas de nitrógeno y fósforo del suelo (Abuzinadah & Read, 1989; Hausling & Marschner, 1989), siendo capaces en ocasiones de emitir ácidos orgánicos que facilitan la mineralización del suelo (Griffiths & Caldwell, 1992).

Los hongos micorrícicos también modifican las relaciones hídricas de la planta huésped (Nelsen, 1987). La conductancia estomática, tasa de transpiración y potencial hídrico en hoja son frecuentemente más altos en planta micorrizada bajo condiciones de estrés

* Autor para la correspondencia: jadonu@terra.es

Recibido: 12-01-04; Aceptado: 25-02-04.

hídrico, debido a una mayor captación hídrica (Augé *et al.*, 1987; Lamhamedi *et al.*, 1992; Duan *et al.*, 1996; Morte *et al.*, 2001) que induce en las plantas mayores tasas de fotosíntesis y contenidos hídricos más altos que las no micorrizadas.

El mecanismo por el cual el hongo micorrícico modifica las relaciones hídricas de la planta huésped es poco conocido. Entre las diversas hipótesis que se plantean para justificar esta influencia están: el efecto indirecto de la mejora nutricional de fósforo en planta micorrizada (Rousseau & Reid, 1990); la mejora de la captación de agua en sistemas radicales micorrizados bien por adición de una fase extraradical miceliar (Ruiz-Lozano y Azcón, 1995), por incremento efectivo de la conductancia hidráulica (Safir *et al.*, 1971; Nardini *et al.*, 2000), o por modificación de la arquitectura radical (Daniels Hetrick *et al.*, 1988; Kothari *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1997); también los cambios hormonales (Coleman *et al.*, 1990; Duan *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1997) o la inducción a la osmorregulación (Augé *et al.*, 1986) pueden modificar las relaciones hídricas de la planta micorrizada.

Pinus halepensis Mill., es una especie forestal que, asociada en simbiosis con diferentes hongos ectomicorrícicos, ha sido ampliamente usada en programas de reforestación y en ensayos de vivero para el área mediterránea, por estar bien adaptada a las condiciones semiáridas (Ruehle *et al.*, 1981; Lapeyrie, 1990; Roldan y Albadalejo, 1994; Roldan *et al.*, 1996; Quejeda *et al.*, 1998; García *et al.*, 2000; Díaz y Roldan, 2000; Morte *et al.*, 2001; Caravaca *et al.*, 2002; González-Ochoa *et al.*, 2003).

La trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) es un hongo micorrícico que tiene una importancia indiscutible desde el punto de vista económico, pero también social y ecológico, especialmente en las áreas rurales españolas. En el ámbito de la ecología de *Tuber melanosporum* Vitt., los autores han comprobado la alta presencia de *Pinus halepensis* Mill. en masas naturales mixtas con producción de trufa negra en la comunidad valenciana, en España (Domínguez, 2002, Domínguez *et al.*, 2003). El establecimiento de repoblaciones de *Pinus halepensis* micorrizado con *Tuber melanosporum* en hábitats (truferos o no) del área mediterránea puede ayudar al mantenimiento y colonización de dichas poblaciones de *Tuber* en el ecosistema del suelo, así como asegurar y mejorar las repoblaciones con *Pinus halepensis* en el área mediterránea, aunque el árbol no llegue a la producción de cuerpos de fructificación.

Existen, por otro lado, pocas experiencias de micorrización artificial de *Pinus halepensis* con trufa negra (Pirazzi, 1986), ya que la mayor parte de los estudios referentes a *Tuber melanosporum* se basan en la importancia del cuerpo de fructificación. En este sentido, ensayos en vivero realizados anteriormente por los autores (Rodríguez *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 2000, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004) mostraron que, entre algunas especies forestales españolas, *P. halepensis* Mill. era una de las más sensibles a mejorar mediante la micorrización artificial.

El objetivo de este trabajo es conocer la influencia de la micorrización con *Tuber melanosporum* Vitt. en la calidad de plántula de *Pinus halepensis* Mill., en aspectos tales como el intercambio gaseoso, nutrición mineral, crecimiento, y colonización radical por hongos micorrícicos durante el primer año de cultivo en vivero.

Material y Métodos

Material vegetal

Las semillas de pino carrasco fueron recogidas en la zona denominada *Levante interior*, en la Comunidad Valenciana. La semilla recibida en el invierno 99/2000 se conservó en bolsa de polietileno cerrada a 4 °C hasta el momento del semillado. Se usaron envases nuevos del tipo *Forest Pot 300* y substratos con base de mezcla de turbas rubia y negra tipo *Sphagnum* de pH 6, con vermiculita en proporción 3:1, y adición de carbonato cálcico (CaCO₃) al 3% en peso, obteniendo al final del ensayo (octubre) un pH del substrato que osciló entre 5 y 6. La turba se esterilizó en autoclave a 120 °C durante tres horas; la semilla fue sometida a inmersión en agua 24 h antes del semillado. Previo al momento del semillado, toda la semilla se sumergió en agua oxigenada al 30% p/v durante 15 min. para su desinfección y posteriormente se lavó tres veces durante tres min. en agua destilada.

Se sembraron 300 alvéolos a finales de marzo. En cada alvéolo se colocaron de 3 a 8 semillas de pino. Después de la germinación se dejó una plántula de pino por cada alveolo. Desde el semillado se mantuvo la planta en invernadero, con riego diario a capacidad de campo y temperatura de cultivo entre los 20 y 30 °C aproximadamente, hasta el momento de la inoculación artificial con *Tuber melanosporum* Vitt.

Inóculo fúngico

El inóculo de trufa negra se preparó a partir de carpóforos procedentes de Molina de Aragón (Guadalajara), recolectados en enero del año 2000. Los carpóforos se limpiaron y esterilizaron mediante flameado superficial, comprobando mediante un corte transversal y «de visu» que la especie era *Tuber melanosporum* Vitt. y no otra posible especie del género *Tuber*. Posteriormente se preparó una suspensión de esporas con agua destilada, que se almacenó a 4 °C hasta el momento de la inoculación.

Inoculación micorrícica

Se aplicaron por inyección en el sustrato unas $4,5 \times 10^5$ esporas/planta, inoculándose a primeros de junio la mitad de la planta producida. Inmediatamente después de la inoculación se sacó la planta a un recinto exterior, con control de riego diario a capacidad de campo. Se realizó un diseño unifactorial de dos niveles distribuido en tres bloques ($1 \times 2 \times 3$) con 40 plantas por unidad experimental. En ningún caso se realizó fertilización adicional sobre la planta, puesto que las plantas responden de una manera más patente a las micorrizas en suelos de baja fertilidad (Marx *et al.*, 1977; Castellano & Molina, 1989).

Medidas

Parámetros fisiológicos y crecimiento

Se realizó un control mensual del crecimiento (desde la inoculación hasta noviembre) y del intercambio gaseoso de la planta (desde la inoculación hasta octubre). Se midieron el potencial hídrico en tallo al mediodía, la fotosíntesis y la transpiración al mediodía. También se tomaron datos de PAR (radiación fotosintéticamente activa) y temperatura en superficie foliar. El potencial hídrico se midió mediante cámara de Scholander (Scholander *et al.*, 1965) y el intercambio gaseoso se midió con un medidor portátil LCA-4. Además, y mediante muestreos destructivos, se realizaron medidas de altura, diámetro, pesos secos aéreo y radical. Antes de pesar las muestras, éstas se secaron en estufa a 65-70 °C durante 48 horas. En cada medida se realizó un muestreo al azar de 3 plantas por bloque y tratamiento. Se completaron las medidas con datos climáticos de la estación meteorológica más cercana (Fig. 4).

Infeción micorrícica

Para estudiar la evolución de las micorrizas, se efectuaron muestreos mensuales y destructivos del sistema radical total, en 3 plantas por bloque y tratamiento. Se caracterizaron y cuantificaron las micorrizas de *Tuber melanosporum* Vitt. y de otros hongos micorrícicos contaminantes que aparecieron. Se cuantificó el total de ápices radicales, micorrizados y no micorrizados, en cada planta, y se calculó el % de ápices micorrizados de *Tuber melanosporum* Vitt.

Análisis de nutrientes

Al final del ensayo (noviembre) se midió la concentración media por planta de los principales nutrientes asimilados: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio. Para ello, se tomó una muestra al azar de 15 plantas por tratamiento que se homogeneizaron en tres grupos de cinco plantas cada uno. El análisis de fósforo, potasio, calcio y magnesio se realizó mediante espectrofotometría de emisión atómica de plasma (ICP), previa digestión en ácido nítrico. La concentración de nitrógeno se determinó en un analizador total LECO (CHN-600).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa *Statgraphics plus 5.0*. Se realizó un análisis de varianza ANOVA para detectar diferencias entre tratamientos y para analizar interacciones entre bloques y tratamientos. Para el análisis de varianza en los parámetros de intercambio gaseoso se introdujeron la temperatura y radiación como covariables. La comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey con $p < 0,05$. En caso de varianzas no homogéneas se aplicó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Resultados

Crecimiento

No se observaron interacciones entre bloques y tratamientos. Se observó para todos los parámetros (Fig. 1), un crecimiento significativamente superior en la planta inoculada respecto al control a los dos meses de la inoculación. Entre junio y noviembre no pa-

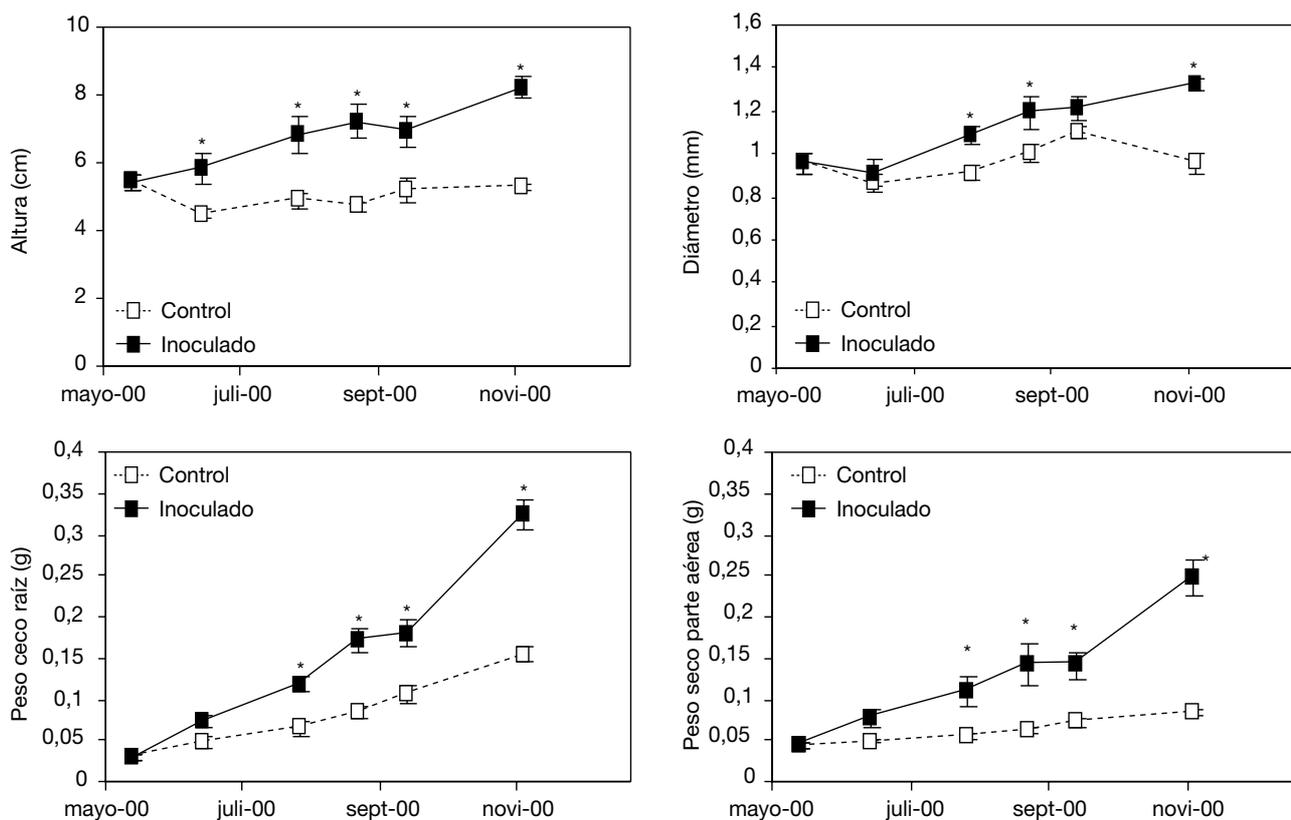


Figura 1. Crecimiento en *Pinus halepensis* Mill. desde la inoculación hasta noviembre/2000. Las barras representan el error estándar. N=9, excepto en noviembre (N=12). * Valores significativamente diferentes según el Test de Tukey con un $p < 0,05$. La flecha indica el momento de la inoculación.

rece haber un incremento de altura o diámetro en la planta control, y es de destacar el fuerte incremento entre octubre y noviembre de los pesos secos de la parte aérea y raíz en la planta inoculada.

Infeción micorrícica

En el análisis mensual de la raíz (Fig. 2), no se observaron interacciones entre bloques y tratamientos. Se observó que las ectomicorrizas, tanto de *T. melanosporum* como de otros hongos, se formaron completamente o bien eran visibles o fácilmente identificables con estereomicroscopio a partir del segundo mes desde la inoculación (agosto). Se encontró a lo largo del análisis un solo morfotipo de micorriza diferente de *Tuber melanosporum*, en este caso ectomicorrizas del grupo *E-strain* (Danielson, 1982). El número total de ectomicorrizas de *Tuber melanosporum* Vitt. creció de forma casi lineal hasta noviembre con unas 160 micorrizas/planta (ápices activos), mientras que el porcentaje de infección subió fuertemente al segundo mes

desde la inoculación (agosto) con una media del 20%, y después subió ligeramente hasta cerca del 30% en octubre, para estabilizarse en noviembre. Tanto el número de ectomicorrizas como de ápices no micorrizados fue en general significativamente superior en planta inoculada que en el control, destacando un fuerte incremento de ambos parámetros para la planta inoculada en el mes de noviembre (95 ectomicorrizas/planta y 326 ápices no micorrizados/planta).

Intercambio gaseoso y potencial hídrico

En los análisis efectuados no se observaron interacciones entre bloques y tratamientos.

El potencial hídrico en tallo (Fig. 3), se mantuvo entre 0 y -1 Mpa. desde la inoculación, con disminución (agosto) y aumento (septiembre) significativo de la planta micorrizada respecto al control.

La temperatura y PAR en superficie foliar no fueron homogéneas (Fig. 3.) puesto que se midió en condiciones ambientales, por lo que se consideraron como cova-

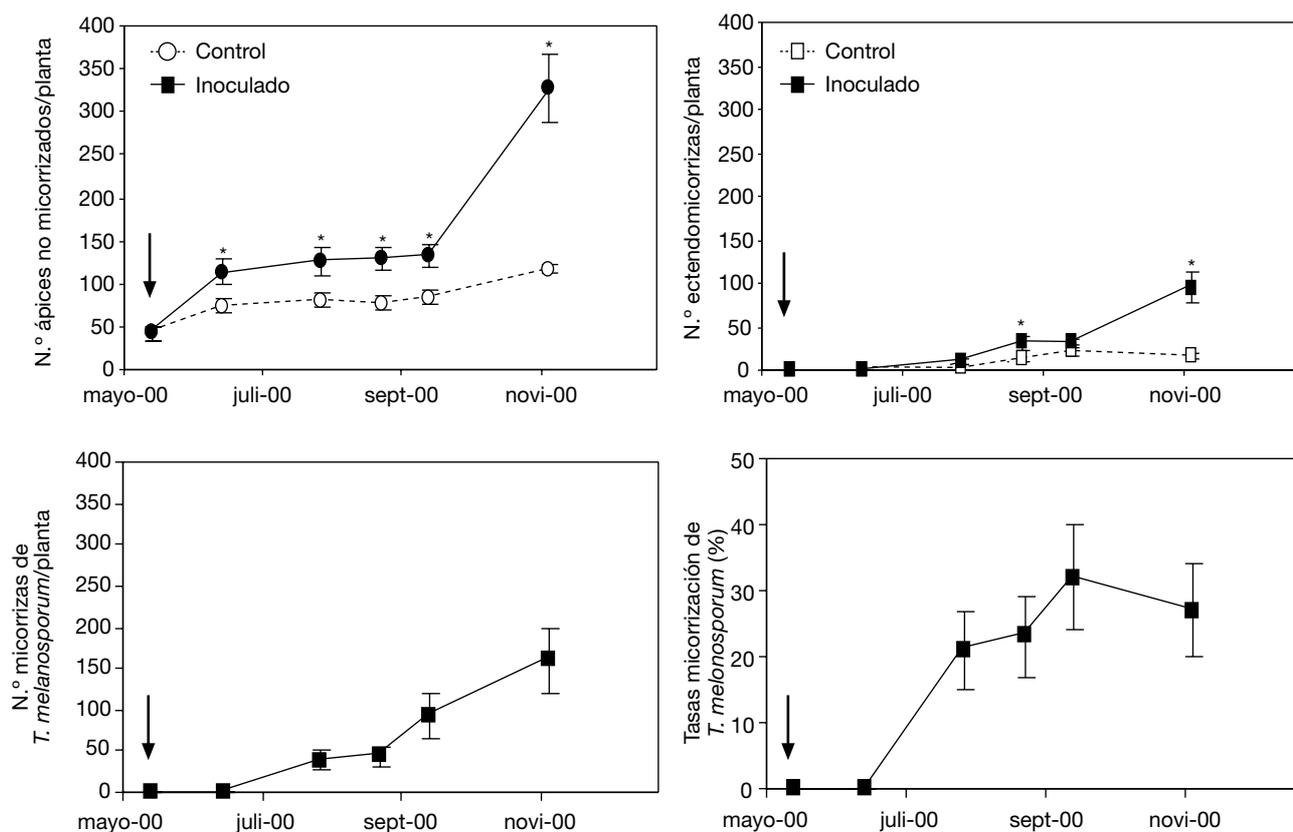


Figura 2. Número y porcentaje de micorrizas de *Tuber melanosporum* Vitt., número de ectendomycorizas (*E-Strain*) y número de ápices no micorrizados en planta de *Pinus halepensis* Mill. desde la inoculación hasta noviembre/2000. Las barras representan el error estándar. N = 9, excepto noviembre (N = 12). * Valores significativamente diferentes según el Test de Tukey con un $p < 0,05$. La flecha indica el momento de la inoculación.

riables para el análisis de la transpiración y fotosíntesis. La tasa de transpiración (Fig. 3) aumentó en julio (un mes después de la inoculación) cercana a $3 \text{ mmol/m}^2/\text{s}$, se mantuvo en este nivel hasta septiembre en el caso de la planta inoculada, pero en el control fue disminuyendo más bruscamente, destacando diferencias significativas entre tratamientos en el mes de septiembre.

La tasa de fotosíntesis (Fig. 3) fue, al mes de la inoculación, significativamente más alta en planta inoculada respecto al control ($2,7 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ en planta inoculada frente a $1,4 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ en el control). En los meses posteriores se igualaron ligeramente las tasas, aunque con tendencia superior en planta inoculada, existiendo nuevamente en octubre diferencias significativas con tasa superior en la planta inoculada ($1,6 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) respecto al control ($1,2 \text{ } \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$).

Nutrición mineral

Los resultados del análisis de nutrientes realizado al final del ensayo (noviembre) se reflejan en la Ta-

bla 1. En la concentración de nitrógeno total asimilado, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. La concentración de fósforo total asimilado fue significativamente superior en planta inoculada respecto al control ($1,26$ frente a $0,86 \text{ mg/g}$). En el potasio asimilado no se produjeron diferencias significativas entre tratamientos. La tasa de calcio asimilado fue significativamente superior en la planta control ($20,2 \text{ mg/g}$) respecto a la planta inoculada ($15,9 \text{ mg/g}$). Respecto al magnesio asimilado, no se produjeron diferencias significativas entre tratamientos.

Discusión

Crecimiento y micorrización

Las ectomicorrizas pueden producir sustancias que promuevan el crecimiento e incrementen la absorción de nutrientes en las plantas (Álvarez, 1991). Las micorrizas favorecen el desarrollo del sistema

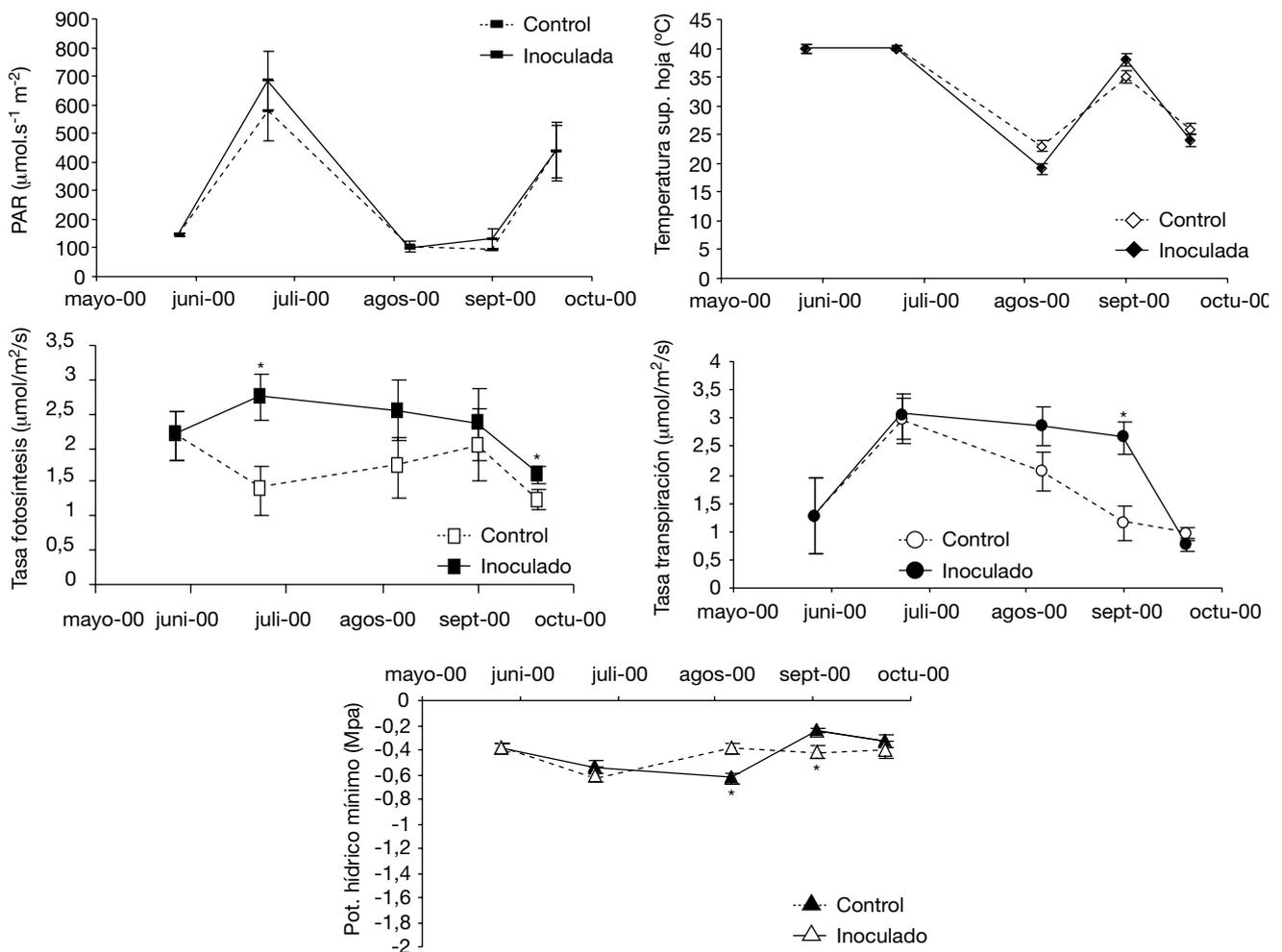


Figura 3. PAR y Tra. en la superficie foliar, tasa de máxima fotosíntesis, transpiración, y potencial hídrico mínimo en tallo de plántula de *Pinus halepensis* Mill. desde el momento de inoculación hasta primeros de octubre. Las barras representan el error estándar. N=9. * Indica valores significativamente diferentes según el Test de Tukey, con un $p < 0,05$. La flecha indica el momento de la inoculación. PAR y Tra. covariables en el análisis de la fotosíntesis y transpiración.

radical (David *et al.*, 1983; Castellano & Molina, 1989) y por tanto potencian la exploración de agua en el suelo. Además éstas incrementan la asimilación de CO_2 (Guehl *et al.*, 1990). Todos estos aspectos hacen incrementar el crecimiento de la planta micorrizada.

En nuestro ensayo la micorrización con *Tuber melanosporum* mejoró el crecimiento de *Pinus halepensis*. Se incrementó el nivel de ramificación radical por estímulo de la micorrización, tal como señalan otros autores (Amaranthus & Perry, 1989; Querejeta *et al.*, 1998), y este incremento se manifestó especialmente en el último mes de muestreo en noviembre. Un mayor sistema radical y un mayor n.º de ápices radicales en planta micorrizada supone una mayor tasa respiratoria, que podría estar relacionada con una mayor de-

manda de carbono en la planta micorrizada (Bjorkman, 1970; Reid *et al.*, 1983; Nylund, 1988; Rousseau & Reid, 1989). Además, la importante aportación de fósforo del hongo a la planta, pudo motivar el incremento del crecimiento de la planta micorrizada.

Pese a que la micorrización con *T. melanosporum* mejoró todos los parámetros de crecimiento, las dimensiones de *P. halepensis* obtenidas como planta de vivero fueron, en general, muy reducidas de acuerdo con las normas sobre material forestal de reproducción de especies no sometidas a la normativa comunitaria (BOE, 1998), debido a la decisión inicial de no aportar fertilizantes que pudieran interaccionar con la micorrización (Marx *et al.*, 1977; Castellano & Molina, 1989), y estudiar de forma eficaz los efectos de la micorrización sobre la planta. Además, la

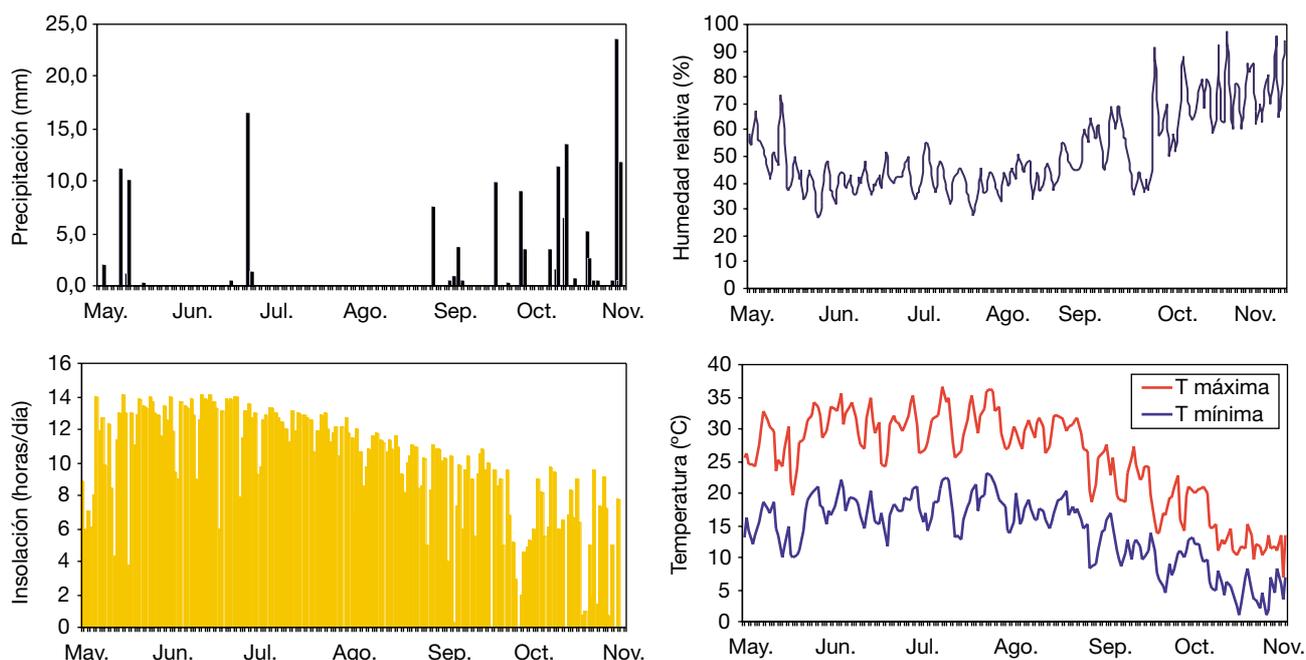


Figura 4. Datos climáticos de la estación más próxima (Madrid-Retiro) durante el ensayo.

esterilización previa del sustrato pudo liberar nutrientes en el proceso. De cualquier forma, la aplicación de fertilizantes en planta micorrizada debe ser realizada con dosis limitadas y equilibradas, tal como indican otros autores (Honrubia *et al.*, 1997; Díaz y Honrubia, 1998; Cartié *et al.*, 1999; Pinkas *et al.*, 2000).

La colonización radical por *Tuber melanosporum* desde junio a noviembre, indicó que, si bien la formación de la estructura del manto de la micorriza puede iniciarse, desde el momento de la germinación esporal, en los primeros 10 días desde el contacto de las hifas con los ápices radiculares (Massicotte *et al.*, 1990; Smith & Read, 1997), la formación del manto fúngico de *T. melanosporum* sobre *P. halepensis* no empezó a ser distinguible hasta el segundo mes desde la inoculación. Parece que desde agosto se estabilizó el porcentaje de micorrización de *T. melanosporum* y que la infección no progresó durante los meses siguientes en porcentaje, aunque sí en número de ápices micorrizados.

Intercambio gaseoso y potencial hídrico

La micorrización hace incrementar la fotosíntesis de planta micorrizada (Reid *et al.*, 1983; Dosskey *et al.*, 1990; Lamhamedi *et al.*, 1992). En nuestro ensayo, un mes después de la inoculación (primeros de julio), la planta inoculada ya tenía una mayor tasa de fotosíntesis que el control. En ese momento no se observan aún micorrizas formadas, pero el número de ápices radiculares en la planta inoculada era mayor que en el control; es decir, que la planta inoculada podría tener en ese momento una mayor tasa de respiración radical que el control (Reid *et al.*, 1983), y por tanto mayores requerimientos de carbono expresados en un incremento de la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis permaneció a lo largo del ensayo ligeramente superior en la planta micorrizada, aunque solo volvió a ser significativamente superior en octubre. En este momento la tasa de micorrización de *Tuber melanosporum* Vitt. es la más alta, y el número total de ápices radiculares en planta micorrizada es uno de los más altos, por lo que las perdi-

Tabla 1. Nutrientes asimilados en *Pinus halepensis* Mill.

| Tratamiento | N (mg/g) | P (mg/g) | K (mg/g) | Ca (mg/g) | Mg (mg/g) |
|-------------|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Control | 9,6 (±0,44) | 0,86 (±0,04) | 8,86 (±0,56) | 20,2 (±1,2)* | 5,6 (±0,75) |
| Inoculado | 9,4 (±0,41) | 1,26 (±0,04)* | 8,09 (±0,56) | 15,9 (±1) | 4,34 (±0,58) |

* Indica diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,05$. Valores entre paréntesis representan el error estándar. N = 3.

das de carbono por respiración radical y la demanda de carbohidratos del hongo pudieron estimular el incremento de la fotosíntesis. La mejora en la captación de fósforo en noviembre induce a pensar que los incrementos en la tasa de fotosíntesis puedan deberse también a la mejor captación de este nutriente por la micorrización. El ajuste de las medias en función de los datos de temperatura foliar y PAR hizo potenciar las diferencias significativas en septiembre para la transpiración, y en octubre para la fotosíntesis.

Las micorrizas permiten una mayor captación hídrica (Augé *et al.*, 1987; Lamhamedi *et al.*, 1992; Duan *et al.*, 1996; Morte *et al.*, 2001). En nuestro ensayo, en condiciones de disponibilidad hídrica (con riegos a capacidad de campo), el potencial hídrico a lo largo del periodo considerado varió poco, entre 0,2 y 0,6 Mpa, y fue casi similar entre tratamientos; excepcionalmente se observó alguna diferencia significativa en el mes de agosto, con potencial hídrico más bajo en planta micorrizada; en este caso la micorrización podía estar provocando una situación de estrés hídrico, obligando a la planta una mayor apertura estomática en un momento en que pese a la disponibilidad hídrica total, hubiera algún problema de absorción hídrica. Este proceso ha sido planteado por otros autores (Pallardy *et al.*, 1995). En el mes de septiembre, la micorrización estaba provocando un mejor estado hídrico de la planta (Ψ significativamente superior), incluso con condiciones de buena disponibilidad hídrica, y por tanto era capaz en ese momento de realizar una transpiración significativamente superior al control.

Es decir, mientras en septiembre el incremento de la transpiración en planta micorrizada parece deberse a mejoras en la captación hídrica, el incremento en planta micorrizada de la fotosíntesis en julio y octubre se debe a otros factores, como la mejor asimilación de fósforo (Rousseau & Reid, 1990), o un posible cambio hormonal sobre la regulación de la apertura de los estomas (Coleman *et al.*, 1990; Duan *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1997) originado por la micorrización.

Los importantes incrementos de crecimiento y la actividad fotosintética de la planta micorrizada en noviembre, podrían señalar una cierta actividad de la simbiosis en otoño, tal como sugieren otros autores (Genet, *et al.*, 2000; Wallander *et al.*, 2001)

formas disponibles de éstos, especialmente del fósforo y nitrógeno (Harley & Smith, 1983), incrementar la superficie de absorción radical (Harvey *et al.*, 1976; Reddell & Malajczuk, 1984; Bending & Read, 1995) o facilitar la mineralización del suelo (Griffiths & Caldwell, 1992). En nuestro ensayo se observó que la micorrización con *T. melanosporum* mejoró la concentración de fósforo asimilado en *P. halepensis*, entre otras cosas, porque la superficie de absorción radical fue incrementada. Por otra parte la micorrización con *T. melanosporum* hizo disminuir la concentración de calcio asimilado en la planta. Esto puede ser el resultado de la acumulación de este nutriente en las hifas en forma de gránulos de polifosfatos (Stark, 1972; Strullu *et al.*, 1983). Harley & Smith (1983) ya hablaban de que el desarrollo de ectomicorrizas incrementaba la concentración interna de fosfato de las plántulas, pero reducía el exceso de calcio.

En condiciones de estrés hídrico la micorrización mejora también las condiciones de la planta. Modifica las relaciones hídricas, e incrementa los valores de la conductancia estomática, la tasa de transpiración y el potencial hídrico en hoja, debido a una mejor captación hídrica. En nuestro ensayo las condiciones eran de buena disponibilidad hídrica, pero sería interesante en posteriores trabajos estudiar la influencia de la micorrización con *Tuber melanosporum* en condiciones de estrés hídrico sobre *Pinus halepensis*, con objeto de aplicar los resultados a repoblaciones forestales en el área mediterránea. En este sentido, en ensayos realizados con varias especies de *Quercus* micorrizados con trufa negra (Domínguez, 2002) hemos observado una mejora significativa de la disponibilidad hídrica de la planta en situación de estrés hídrico tanto en vivero como en plantación.

Como conclusión podemos decir que, en condiciones de disponibilidad hídrica y con fertilización deficiente que condicionó el desarrollo de las plántulas, la micorrización de *Pinus halepensis* con *Tuber melanosporum* puede mejorar el crecimiento de la plántula en vivero, incrementando la superficie de absorción radical, mejorando la asimilación de fósforo y limitando el exceso de calcio, con incrementos puntuales en el intercambio gaseoso.

Nutrición mineral

La simbiosis micorrícica es capaz de mejorar la aportación de nutrientes a la planta, al incrementar las

Agradecimientos

Este ensayo se realizó en el ámbito del proyecto «Desarrollo de Procedimientos de Producción de Setas Co-

mestibles de Hongos de Micorrización como Alternativa a la Obtención de Productos Excedentarios de Cultivo Agrícola» mediante convenio entre la Universidad Politécnica de Madrid y la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Comunidad de Cantabria.

Al Dpto. de Medio Ambiente del INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias), al Dpto. de Silvopascicultura de las E.U.I.T Forestal y E.T.S.I. Montes de Madrid, por la infraestructura aportada. A Mercedes Teyssiere, becaria de U.P. de Madrid; al laboratorio de Anatomía y Fisiología Vegetal de E.T.S.I. de Montes de Madrid, y en especial a Ismael Aranda, por el apoyo prestado.

Referencias bibliográficas

- ABUZINADAH R.A., READ D.J., 1989. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. IV. The utilization of peptides by birch (*Betula pendula* L.) infected with different mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 112, 55-60.
- ÁLVAREZ I., 1991. Ecología, fisiología e implicaciones prácticas de las micorrizas. P. 247-259. En Fijación y movilización biológica de nutrientes, Vol II. Fijación de N y Micorrizas, Olivares, J., and J.M. Barea (eds.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.
- AMARANTHUS M.P., PERRY D., 1989. Rapid root tip and mycorrhiza formation and increased survival of Douglas-fir seedlings after soil transfer. *New For* 3, 77-82.
- AUGÉ R.M., SCHEKEL K.A., WAMPLE R.L., 1987. Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimatation. *Physiol Plant* 70, 175-182.
- AUGÉ R.M., SCHEKEL K.A., WAMPLE R.L., 1986. Osmotic adjustment in leaves of VA mycorrhizal and non mycorrhizal rose plants in response to drought stress. *Plant Physiol* 82, 765-770.
- BENDING G.D., READ D.J., 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytologist* 130, 401-409.
- BJORKMAN E., 1970. Mycorrhiza and tree nutrition in poor forest soils. *Studia Forestalia Suecica* 83, 1-24.
- BOLAN N.S., 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134, 189-207.
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO, 1998. Real Decreto 1356/98 de 26 de junio. Normas aplicables a la producción, comercialización y utilización de materiales forestales de reproducción de especies no sometidas a la normativa comunitaria: Anexo VIII. B.O.E. 27/06/98.
- CARAVACA F., GARCÍA C., HERNÁNDEZ M.T., ROLDÁN A., 2002. Aggregate stability changes after organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halepensis*. *Applied Soil Ecology* 19(3), 199-208.
- CARTIÉ G., PALAZÓN C., DELGADO I., BARRIUSO J., 1999. Estudio de la Influencia de seis factores a tres niveles, sobre el proceso de micorrización de *Quercus ilex* por *Tuber melanosporum* y sobre la mortalidad producida en el mismo. Vº International Congress Science and Cultivation of Truffle. Aix-en-Provence, France.
- CASTELLANO M.A., MOLINA R., 1989. Mycorrhizae. P. 101-167 in The container tree nursery manual, Volume 5. *Agric. Handb.* 674, Landis, T.D., et al. (eds.). USDA For. Serv., Washington, DC.
- COLEMAN M.D., BLEDSOE C.S., SMIT B.A., 1990. Root hydraulic conductivity and xylem sap levels of zeatin riboside and abscisic acid in ectomycorrhizal Douglas fir seedlings. *New Phytol* 115, 275-284.
- DANIELS HETRICK B.A., LESLIE J.F., THOMPSON WILSON G., GERSCHEFSKE KITT G.D., 1988. Physical and topological assessment of effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on root architecture of big bluestem. *New Phytologist* 110, 85-96.
- DANIELSON R.M., 1982. Taxonomic affinities and criteria for identification of the common ectomycorrhizal symbionts of pines. *Can J Bot* 60, 7-18.
- DAVID A., FAYE M., RANCILLAC M., 1983. Influence of auxin and mycorrhizal fungi on the in vitro formation and growth of *Pinus pinaster* roots. *Plant and Soil* 71, 501-505.
- DÍAZ E., ROLDÁN A., 2000. Effects of reafforestation techniques on the nutrient content, photosynthetic rate and stomatal conductance of *Pinus halepensis* seedlings under semiarid conditions. *Land Degradation & Development* 11(5), 475-486.
- DÍAZ G., HONRUBIA M., 1998. Factors affecting mycorrhizal infection of containerized *Pinus halepensis* by *Suillus* sp., *Rhizopogon* sp., and *Pisolithus tinctorius* in nursery conditions. Abstracts 2º International Conference on Mycorrhiza. ICOM II, 51.
- DOMÍNGUEZ J.A., RODRÍGUEZ J.A., REYNA S., SAIZ DE OMEÑACA J.A., ZAZO J., PÉREZ R., GALIANA F., 2000. Mejora de la Nutrición Mineral en Planta Forestal Mediante Micorrización Controlada en Vivero. VIII Simposio Nacional- IV Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas: Nutrición Mineral en una Agricultura Mediterránea Sostenible. Murcia. España.
- DOMÍNGUEZ J.A., 2002. Aportaciones de la micorrización artificial con *Tuber melanosporum* Vitt. en planta forestal. Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.
- DOMÍNGUEZ J.A., LÓPEZ C., RODRÍGUEZ J.A., SAIZ DE OMEÑACA J.A., 2003. Caracterización de rodales truferos en la Comunidad Valenciana. *Ecología* 17, 181-190.
- DOMÍNGUEZ J.A., PLANELLES R., RODRÍGUEZ J.A., SAIZ DE OMEÑACA J.A., ZAZO J., TEYSSIERE M., MARTINEZ G., PINAZO O., 2001. Estado hídrico y demanda de fotosíntesis de *Quercus ilex*, *Quercus faginea* y *Pinus halepensis* micorrizados artificialmente con *Tuber melanosporum* en vivero. III Congreso Forestal Español. Granada. España.

- DOSSKEY M.G., LINDERMAN R.G., BOERSMA L., 1990. Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas-fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytol* 115, 269-274.
- DUAN X., NEUMAN D.S., REIBER J.M., GREEN C.D., SAXTON A.M., AUGÉ R.M., 1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors involved in the control of stomatal conductance during drought. *J Exp Bot* 47, 1541-1550.
- EBEL R.C., DUAN X., STILL D.W., AUGÉ R.M., 1997. Xylem sap abscisic acid concentration and stomatal conductance of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in drying soil. *New Phytol* 135, 755-761, 1997.
- GARCÍA C., HERNÁNDEZ T., ROLDÁNA., ALBALADEJO J., CASTILLO V., 2000. Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soils with *Pinus halepensis* Mill.: effect on their microbial activity. *Soil Biology & Biochemistry* 32(8-9), 1173-1181.
- GENET P., PREVOST A., PARGNEY J.C., 2000. Seasonal variations of symbiotic ultrastructure and relationships of two natural ectomycorrhizae of beech (*Fagus sylvatica*/*Lactarius blennius* var. *viridis* and *Fagus sylvatica*/*Lactarius subdulcis*). *Trees Structure and Function* 14(8), 465-474.
- GONZÁLEZ-OCHOA A.I., DE LAS HERAS J., TORRES P., SÁNCHEZ-GÓMEZ E., 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Annals of Forest Science* 60(1), 43-48.
- GRIFFITHS R.P., CALDWELL B.A., 1992. Mycorrhizal mat communities in forest soils. In: Read DJ, Lewis DH, Fitter AH & Alexander IJ eds. *Mycorrhizas in Ecosystems*. C. A. B. International, Wallingford pp. 98-105.
- GUEHL J.M., MOUSAIN D., FALCONNET G., GRUEZ J., 1990. Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water use efficiency of *Pinus pinea* L seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. *Ann Sci For* 47, 91-100.
- HARLEY J.L., SMITH S.E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- HARVEY A.E., LARSEN M.J., JURGENSEN M.F., 1976. Distribution of ectomycorrhizae in a mature douglas-fir/larch soil in western Montana. *Forest Science* 22, 393-633.
- HAUSLING M., MARSCHNER H., 1989. Organic and inorganic soil phosphates and soil phosphatase activity in the rhizosphere of 80-year-old norway spruce [*Picea abies* (L) Karst.] trees. *Biology and Fertility of Soils* 8, 128-133.
- HONRUBIA M., CARRILLO C., PEÑUELAS J., DOMÍNGUEZ S., VILLAR P., OCAÑA L., 1997. Influencia de la fertirrigación en la micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero. *Actas II Congreso Forestal Español*. I Congreso Forestal Hispano-Luso. *Irati* 97(3), 307-312.
- KOTHARI S.K., MARSCHNER H., GEORGE E., 1990. Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. *New Phytologist* 116, 303-311.
- LAMHAMED M.S., BERNIER P.Y., FORTIN J.A., 1992. Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. *Tree Physiology* 10, 153-167.
- LAPEYRIE F., 1990 The role of ectomycorrhizal fungi in calcareous soil tolerance by «symbiocalcicole» woody plants. *Ann Sci For* 47, 579-589.
- MARX D.H., HATCH A.B., MEDICINO J.F., 1977. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany* 55, 1569-1574.
- MASSICOTTE H.B., PETERSON R.L., ACKERLEY C.A., MELVILLE L.H., 1990. Structure and ontogeny of *Betula alleghaniensis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 68, 579-593.
- MILLER R.M., HETRICK B.A.D., WILSON G.W.T., 1997. Mycorrhizal fungi affect root stele tissue in grasses. *Canadian Journal of Botany* 75, 1778-1784.
- MORTE A., DÍAZ G., RODRÍGUEZ P., ALARCÓN J.J., SÁNCHEZ-BLANCO M.J., 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* 44 (2), 263-267.
- NARDINI A., SALLEO S., TYREE M., VERTOVEC M., 2000. «Influence of the ectomycorrhizas formed by *Tuber melanosporum* Vitt. on hydraulic conductance and water relations of *Quercus ilex* L. seedlings». *Ann For Sci* 57, 305-312.
- NELSEN C.E., 1987. The water relations of vesicular-arbuscular mycorrhizal systems. In: SAFIR GR(Ed.) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC, Boca Raton, Fla, pp. 71-91.
- NYLUND J.E., 1988. The regulation of mycorrhiza formation-carbohydrate and hormone theories reviewed. *Scandinavian Journal of Forest Research* 3, 465-479.
- PALLARDY S.G., CERMÁK J., EWERS F.W., KAUFMANN M.R., PARKER W.C., SPERRY J.S., 1995. Water transport dynamic in trees and stands. In: SMITH M.K., HINCKLEY, W.K. (Ed.): *Resource Physiology of Conifers: Acquisition, Allocation and Utilization*. pp. 301-389. Academic Press, London.
- PINKAS Y., MAIMON M., SHABI E., ELISHA S., SHMULEWICH Y, FREEMAN S., 2000. Inoculation, isolation and identification of *Tuber melanosporum* from old and new oak host in Israel. *Mycol Res* 104, 472-477.
- PIRAZZI R., 1986. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus nigra* Arnold with *Tuber melanosporum* Vitt. and *Tuber brumale* Vitt. var. *moscatum* Ferry. *Micologia Italiana* 15(1), 5-11.
- QUEREJETA J.I., ROLDAN A., ALBALADEJO J., CASTILLO V., 1998. The role of mycorrhizae, site preparation, and organic amendment in the afforestation of a semi-arid Mediterranean site with *Pinus halepensis*. *For Sci* 44, 203-211.
- REDDELL P, MALAJCZUK N., 1984. Formation of mycorrhizae by jarrah (*Eucalyptus marginata* Donn. ex Smith) in litter and soil. *Australian Journal of Botany* 32, 511-520.
- REID C.P.P., KIDD F.A., EKWEBELAM S.A., 1983. Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. *Plant and soil* 71, 415-432.

- RODRÍGUEZ J.A., REYNA S., DOMÍNGUEZ J.A., SAIZ DE OMEÑACA J.A., ZAZO J., PÉREZ R., GALIANA F., 1999. Producción de Plantas Micorrizadas de Calidad; Implantación, Mantenimiento y Mejora de Rodales Productores de Trufa y Otras Setas. Reunión final de Coordinación del Programa de Investigación y desarrollo en relación con la restauración de la Cubierta Vegetal. C.E.A.M. (Fundación Centro de Estudios Ambientales del Mediterráneo). Castellón.
- RODRÍGUEZ J.A., REYNA S., DOMÍNGUEZ J.A., SAIZ DE OMEÑACA J.A., ZAZO J., PÉREZ R., GALIANA F., 2004. Producción de Planta Inoculada con trufa negra. En «La Gestión del Monte Mediterráneo». Fundación C.E.A.M. Valencia. (Pendiente de publicación).
- ROLDÁN A., ALBALADEJO J., 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biology and Fertility of soils* 18(2), 143-149.
- ROLDÁN A., QUEREJETA I., ALBALADEJO J., CASTILLO V., 1996. Growth response of *Pinus halepensis* to inoculation with *Pisolithus arhizus* in a terraced rangeland amended with urban refuse. *Plant and Soil* 179(1), 35-43.
- ROUSSEAU J.V.D., REID C.P.P., 1989. Measurement of carbon cost in ectomycorrhiza. In: Applications of continuous and steady-state methods to root biology. J.G. TORREY & L.J. WINSHIP Ed.
- ROUSSEAU J.V.D., REID C.P.P., 1990. Effects of phosphorus and ectomycorrhizas on the carbon balance of loblolly pine seedlings. *Forest Science* 36, 101-112.
- RUEHLE J. L., MARX D.H., AUBOROUGH M., 1981 Development of *Pisolithus tinctorius* and *Telephora terrestris* ectomycorrhizae on seedlings of coniferous trees important to Morocco. *Ann Rech For Maroc* 1, 283-296.
- RUIZ-LOZANO J.M., AZCÓN R., 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol. Plant* 95, 472-478.
- SAFIR G.R., BOYER J.S., GERDEMANN J.W., 1971. Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science* 172, 581-583.
- SCHOLANDER P.F., HAMMEL H.T., BRADSTREET E.D., HEMMINGSEN E.A., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148, 339-346.
- SCHWEIGER P.F.G., 1994. *Factors effecting VA mycorrhizal uptake of phosphorus*. PhD Thesis, University of Western Australia, Perth.
- SMITH S.E., READ D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd Ed. Academic Press. 605 pp. London
- STARK N., 1972. Nutrient cycling pathways and litter fungi. *Bioscience* 22, 355-360.
- STRULLU D.G., HARLEY J.L., GOURRET J.P., GARREC J.P., 1983. A note on the relative phosphorus and calcium contents of metachromatic granules in *Fagus mycorrhiza* 94, 89-94.
- TARAFDAR J.C., MARSCHNER H., 1994. Efficiency of VAM hyphae in utilisation of organic phosphorus by wheat plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 40, 593-600.
- WALLANDER H., NILSSON L.O., HAGERBERG D., BAATH E., 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist* 151 (3), 753-760.