

Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España

J. Pera* y J. Parladé

Departament de Protecció Vegetal. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Centre de Cabrils, ctra. de Cabrils s/n. 08348 Cabrils. Barcelona

Resumen

Desde el trabajo publicado por Pardos en 1962, se ha desarrollado una importante actividad investigadora en el campo de las ectomicorizas en España; especialmente en los últimos 20 años. En este artículo, revisaremos los avances conseguidos en el estudio de los hongos ectomicorrícicos en lo que se refiere a su aplicación a la producción de planta para repoblación y a los resultados obtenidos en plantaciones experimentales. Los resultados publicados, principalmente con coníferas inoculadas con hongos de los géneros: *Hebeloma*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* o *Suillus*, demuestran que la micorrización controlada con hongos seleccionados mejora los procesos de repoblación y revegetación en distintas situaciones ambientales, como: el establecimiento de masas en suelos forestales productivos, tanto con especies autóctonas como con especies exóticas de rápido crecimiento, la repoblación de suelos agrarios abandonados, o la revegetación de suelos áridos de la zona mediterránea.

Palabras clave: ectomicorriza, vivero forestal, micorrización de plantones, supervivencia y crecimiento en plantación, reforestación, revegetación.

Abstract

Controlled inoculation of reforestation seedlings with ectomycorrhizal fungi: current knowledge in Spain

After the paper published by Pardos in 1962 a considerable effort of investigation on ectomycorrhizas has been done in Spain, especially during the last 20 years. In our article we review the progress achieved in our country concerning the knowledge of ectomycorrhizal fungi, in particular their use in the controlled inoculation of nursery grown plants for reforestation and revegetation purposes, and the performance of these mycorrhizal plants in experimental plantations. Published results mainly involve different conifer species inoculated with fungi belonging to the genera: *Hebeloma*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma* or *Suillus*. These results show that controlled mycorrhizal inoculations with selected fungi improve the reforestation and revegetation processes in defined environmental situations, such as: reforestation of productive forest soils, both using native or introduced tree species, reforestation of set-aside agricultural lands, or revegetation of arid soils in the Mediterranean regions of Spain.

Key words: ectomycorrhiza, forest nursery, seedling mycorrhization, field performance, reforestation, revegetation.

Introducción

Del orden del 95% de las especies de plantas terrestres conocidas establecen una simbiosis, a nivel radical y de forma natural, con una serie de hongos del suelo.

Esta simbiosis hongo - raíz se conoce con el nombre de micorriza. Se han descrito distintos tipos de micorizas en función de las estructuras que forman, aunque para las especies arbóreas de interés forestal el tipo de micorriza más importante es el conocido como ectomicorriza (Marks y Kozłowski, 1973; Harley y Smith, 1983; Smith y Read, 1997). Las ectomicorizas se desarrollan en las raíces cortas y absorbentes del sistema radical de unas 450 especies vegetales, entre las que se incluyen

* Autor para la correspondencia: joan.pera@irta.es
Recibido: 01-07-05; Aceptado: 15-07-05.

casi todos los miembros de las familias *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Pinaceae*, o *Salicaceae*. Los hongos formadores de ectomicorizas pertenecen a los *Basidiomycotina* y *Ascomycotina*, e incluyen muchas de las especies, tanto epigeas como hipogeas, comunes en los bosques.

Los primeros trabajos experimentales en el campo de la fisiología de las ectomicorizas, realizados en la primera mitad del siglo XX, demostraron ya que las plantas micorrizadas se desarrollaban mejor que las no micorrizadas y que además contenían mayores cantidades de los principales nutrientes por unidad de masa (Hatch, 1937). Desde entonces se ha dedicado un importante esfuerzo de investigación en todo el mundo y se han probado distintas hipótesis para dar explicación al papel de la simbiosis ectomicorrícica en la absorción de agua y los principales nutrientes del suelo (fósforo y nitrógeno) (Harley y Smith, 1983; Tarkka *et al.*, 2005), el papel de estos hongos en el aporte de sustancias vitamínicas o reguladoras del crecimiento vegetal (Barker y Tagu, 2000), sus relaciones con el resto de microorganismos de la rizosfera (Perry *et al.*, 1987), su papel en el control biológico de determinados patógenos de raíz (Whipps, 2004), y su papel en el conjunto del ecosistema forestal, donde los hongos ectomicorrícicos intervienen en la renovación de la biomasa y los ciclos de nutrientes, así como en las relaciones de competencia o cooperación que se establecen entre las plantas por la captación de agua y nutrientes (van der Heijden y Sanders, 2002).

En España, desde el primer trabajo bien documentado sobre ectomicorizas publicado por Pardos en 1962, se han escrito varias revisiones sobre distintos aspectos de la simbiosis ectomicorrícica (Álvarez 1991, Honrubia *et al.*, 1992; 1995; Honrubia 2000), y se han desarrollado numerosos trabajos de investigación en este campo, especialmente a partir de finales de los años 80. En el presente artículo, recopilaremos (Tabla 1) y revisaremos los avances realizados en España en el estudio de los hongos ectomicorrícicos respecto a su aplicación a la producción en vivero de planta para repoblación o revegetación, y los resultados obtenidos hasta el momento en plantaciones experimentales.

La simbiosis ectomicorrícica y su aplicación a la repoblación forestal

En toda repoblación forestal la calidad de la planta que se utilizará es de capital importancia. Esta calidad vendrá determinada por el origen del material vegetal utilizado y por el manejo al que se someta durante la fase de producción viverística. Frecuentemente, los criterios para determinar la calidad de una planta se habían limitado a evaluar el estado y el tamaño de la parte aérea. De un tiempo a esta parte se presta también una suficiente atención a la calidad del sistema radical, en reconocimiento a su enorme importancia en la captación de agua y nutrientes. La formación de ectomicorizas es el estado natural de la casi totalidad de los árboles de nuestros bosques, y por tanto, parte integrante de sus sistemas radicales y un factor a tener en cuenta a la hora de valorar su calidad.

La importancia de las ectomicorizas en la práctica forestal se estableció hace ya mucho tiempo. Por un lado, se demostró que los graves problemas de crecimiento de los plantones de algunos viveros estaban asociados a su errática y escasa micorrización, causada por la baja densidad de propágulos ectomicorrícicos presentes en el suelo (Mitchell *et al.*, 1937; Trappe y Strand, 1969). Pardos, en 1962, llegó a similares conclusiones estudiando la clorosis que presentaban las plántulas de pino laricio (*Pinus nigra* var. *austriaca*) cultivadas en un vivero de Guadalajara. Observó que la presencia de ectomicorizas estaba relacionada con la recuperación de las plantas en el segundo año de crecimiento, mientras que las que no llegaban a formar esta simbiosis permanecían cloróticas. En muchos viveros es necesaria la introducción de hongos ectomicorrícicos ya que no cuentan con una población natural de hongos adecuada.

Como ya habíamos dicho, la formación de ectomicorizas es el estado natural de la casi totalidad de las especies arbóreas forestales, pero muchos de los factores físicos o químicos que afectan a la productividad y sanidad de los bosques, afectan también a los hongos ectomicorrícicos y al establecimiento de la simbiosis con

Tabla 1. Recopilación de los resultados obtenidos en España, ordenados según las especies vegetales y las especies fúngicas ectomicorrícicas que han sido utilizadas para su aplicación en la micorrización controlada de planta de vivero y establecidas en repoblaciones o revegetaciones experimentales.

Especie vegetal	Especie fúngica	Referencia bibliográfica
<i>Pinus halepensis</i> Mill.	<i>Amanita spissa</i> (Fr.) P. Kumm.	Torres y Honrubia, 1994a.
	<i>Hebeloma edurum</i> Métrod ex Bon.	Torres y Honrubia, 1994a.
	<i>Lactarius deliciosus</i> (L.: Fr.) SF Gray.	Torres y Honrubia, 1994a; Rodríguez-Barreal <i>et al.</i> , 1994; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Lactarius sanguifluus</i> (Paulet: Fr.) Fr.	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Cok. & Couch = [<i>Pisolithus arhizus</i> (Pers) Rauschert]	Torres <i>et al.</i> , 1991; Torres y Honrubia, 1994a; Torres y Honrubia, 1994b; Roldán y Albaladejo, 1994; Roldán <i>et al.</i> , 1996; Honrubia <i>et al.</i> , 1997b; Querejeta <i>et al.</i> , 1998; García <i>et al.</i> , 2000; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002; Caravaca <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.	Parladé <i>et al.</i> , 2004.
	<i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda ex Sturm) Fr.	Torres <i>et al.</i> , 1991; Roldán y Albaladejo, 1994; Torres y Honrubia, 1994b; Honrubia <i>et al.</i> , 1997b; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002; Parladé <i>et al.</i> , 2004.
	<i>Suillus bellini</i> (Inzenga) O. Kuntze.	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Suillus collinitus</i> (Fr.) Kuntze	Torres <i>et al.</i> , 1991; Roldán y Albaladejo, 1994; Torres y Honrubia, 1994b; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002; Barberà <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) Kunt.	Rodríguez-Barreal <i>et al.</i> , 1994; Rincón <i>et al.</i> , 2005.
	<i>Suillus luteus</i> (L. ex Fr.) SF Gray.	Torres y Honrubia, 1994a.
	<i>Suillus mediterraneus</i> (Jacquet. & Blum.)	Honrubia <i>et al.</i> , 1997b. Morte <i>et al.</i> , 2001; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003.
	<i>Suillus variegatus</i> (Swartz: Fr.) Kuntze.	Torres y Honrubia, 1994a.
	<i>Tuber melanosporum</i> Vittadini	Rodríguez-Barreal <i>et al.</i> , 1994.
<i>Pinus pinaster</i> Ait.	<i>Amanita muscaria</i> (L.) Pers.	Pera <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> (Bull.) Qué!	Pera <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Hymenogaster vulgaris</i> Tul. & Tul.	Pera <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Laccaria bicolor</i> (Maire) Orton.	Pera <i>et al.</i> , 1993; Perrin <i>et al.</i> , 1994; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1999.
	<i>Laccaria laccata</i> (Scop. ex Fr.) B. & Br.	Pera <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Lactarius deliciosus</i>	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Lactarius sanguifluus</i>	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Melanogaster ambiguus</i> (Vittad.) Tul. & Tul.	Pera <i>et al.</i> , 1993; Parladé <i>et al.</i> , 1996; Parladé <i>et al.</i> , 1997.
	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Pera <i>et al.</i> , 1993; Pera <i>et al.</i> , 1994; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Rhizopogon roseolus</i>	Pera <i>et al.</i> , 1993; Parladé <i>et al.</i> , 1996; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1999a; González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Suillus bellini</i>	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Suillus collinitus</i>	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Suillus mediterraneus</i>	González-Ochoa <i>et al.</i> , 2003; De las Heras <i>et al.</i> , 2002.
	<i>Scleroderma citrinum</i> Pers.: Pers	Pera <i>et al.</i> , 1993; Parladé <i>et al.</i> , 1996.
<i>Pseudotsuga menziesii</i> (Mirb.) Franco	<i>Hebeloma sinapizans</i> (Paulet:Fr.)Gill.	Parladé <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Hymenogaster vulgaris</i>	Parladé <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Laccaria bicolor</i>	Le Tacon <i>et al.</i> , 1992; Parladé <i>et al.</i> , 1993; Parladé y Alvarez, 1993; Álvarez <i>et al.</i> , 1994; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1999a; Parladé <i>et al.</i> , 1999b; Pera <i>et al.</i> , 1999.
	<i>Laccaria laccata</i>	Parladé <i>et al.</i> , 1993.
	<i>Melanogaster ambiguus</i>	Parladé <i>et al.</i> , 1996; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1999b; Pera <i>et al.</i> , 1999.
	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Parladé y Alvarez, 1993; Pera <i>et al.</i> , 1994.
	<i>Rhizopogon colossus</i> Smith Meg Smith.	Pera <i>et al.</i> , 1999.
	<i>Rhizopogon roseolus</i>	Parladé y Alvarez, 1993.
	<i>Rhizopogon subareolatus</i> Smith	Parladé y Alvarez, 1993; Parladé <i>et al.</i> , 1993; Parladé <i>et al.</i> , 1996; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1999a; Parladé <i>et al.</i> , 1999b; Pera <i>et al.</i> , 1999.
	<i>Tuber maculatum</i> Vittadini.	Parladé <i>et al.</i> , 1999b.

Especie vegetal	Especie fúngica	Referencia bibliográfica
<i>Pinus pinea</i> L.	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> <i>Laccaria bicolor</i> <i>Melanogaster ambiguus</i> <i>Pisolithus tinctorius</i> <i>Rhizopogon luteolus</i> <i>Rhizopogon roseolus</i> <i>Scleroderma verrucosum</i> Bull. ex Pers. ss.Grév.	Rincón <i>et al.</i> , 2001. Rincón <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Rincón <i>et al.</i> , 2001. Rincón <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Rincón <i>et al.</i> , 2001. Rincón <i>et al.</i> , 1997; Rincón <i>et al.</i> , 2001. Rincón <i>et al.</i> , 1997; Parladé <i>et al.</i> , 1997; Rincón <i>et al.</i> , 2001; Parladé <i>et al.</i> , 2004. Rincón <i>et al.</i> , 2001; Parladé <i>et al.</i> , 2001; Parladé <i>et al.</i> , 2004. Rincón <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pinus radiata</i> D. Don.	<i>Rhizopogon luteolus</i> <i>Rhizopogon roseolus</i> <i>Scleroderma citrinum</i>	Pascual <i>et al.</i> , 2001; Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004a. Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004a; Ortega <i>et al.</i> , 2004. Pascual <i>et al.</i> , 2001; Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004a; Ortega <i>et al.</i> , 2004.
<i>Betula celtiberica</i> Rothm. & Vasc.	<i>Lactarius blumii</i> Bon. <i>Leccinum scabrum</i> (Bull.: Fr.) Gray <i>Scleroderma citrinum</i>	Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001 Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004b. Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004b.
<i>Fagus sylvatica</i> L.	<i>Scleroderma citrinum</i> <i>Scleroderma verrucosum</i>	Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001; Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004b. Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001.
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	<i>Scleroderma citrinum</i> <i>Scleroderma verrucosum</i>	Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001. Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001.
<i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	<i>Pisolithus tinctorius</i> <i>Scleroderma citrinum</i> <i>Scleroderma verrucosum</i>	Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004b. Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001; Duñabeitia <i>et al.</i> , 2004b. Duñabeitia <i>et al.</i> , 2001.
<i>Quercus robur</i> L.	<i>Scleroderma citrinum</i>	Hormilla <i>et al.</i> , 1997.
<i>Quercus coccifera</i> L.	<i>Pisolithus tinctorius</i> <i>Scleroderma verrucosum</i>	Maestre <i>et al.</i> , 2002, Caravaca <i>et al.</i> , 2005. Caravaca <i>et al.</i> , 2005.
<i>Cistus albidus</i> L.	<i>Pisolithus tinctorius</i> <i>Scleroderma verrucosum</i>	Alguacil <i>et al.</i> , 2003. Caravaca <i>et al.</i> , 2005.
<i>Cistus ladanifer</i> L.	<i>Laccaria laccata</i>	Torres <i>et al.</i> , 1995.

los árboles. Los contaminantes atmosféricos como el ozono (O₃) o el dióxido de azufre (SO₂), actuando de forma combinada, reducen la biomasa aérea y radical de *Pinus halepensis* y la proporción de raíces micorizadas (Díaz *et al.* 1996). Así mismo, estos autores notaron alteraciones morfológicas en las micorrizas formadas en presencia de ambos contaminantes y un cambio en la composición de las especies fúngicas asociadas.

Distintos factores medioambientales, bióticos y abióticos, causan el declive de los bosques (C.E.P.E., 2004). Los hongos ectomicorrícicos también pueden verse directa o indirectamente afectados por estos mismos factores. Honrubia y Díaz (1996) estudiaron el efecto de la lluvia ácida sobre la formación de micorrizas y el desarrollo de *Pinus halepensis*, especialmente el desarrollo radical, en condiciones controladas. A partir de sus datos, concluyeron que en suelos calcáreos

de pH neutro-básico la deposición ácida no producía efectos negativos sobre la micorrización y tampoco sobre los hongos ectomicorrícicos, en particular en las especies del género *Suillus*.

Las poblaciones de hongos micorrícicos se ven adversamente afectadas por procesos o actividades que perturban y degradan los suelos, como: los incendios forestales (Fernández de Ana Magán y Rodríguez, 1992; Torres y Honrubia, 1994d, 1997; De Las Heras *et al.*, 2002; De Román y De Miguel, 2002), o la contaminación causada por la actividad minera (Díaz y Honrubia, 1994). Evidentemente, la desaparición de la cubierta vegetal, ya sea por causas naturales o debidas a la actividad humana, provoca la desaparición de las poblaciones naturales de hongos micorrícicos. Por todo ello, la reintroducción o el restablecimiento de los hongos ectomicorrícicos debe tenerse especialmente en

cuenta al abordar la reforestación o revegetación de una zona afectada por algún proceso de erosión o degradación del suelo.

La persistencia de los hongos ectomicorrícicos en el suelo forestal, y en las raíces de las plantas, se ve afectada por distintos factores. Las situaciones de sequía o estrés hídrico influyen claramente no sólo sobre la planta sino también sobre las micorrizas. Lansac *et al.* (1995) trabajando con distintas especies arbustivas típicas de la zona mediterránea, demostraron que la colonización micorrícica, así como la biomasa y la relación entre parte aérea y radical, disminuían significativamente cuando las plantas se sometían a periodos moderados de sequía. La simbiosis ectomicorrícica entre *Cistus ladanifer* y *Laccaria laccata* parecía verse más afectada por el estrés hídrico que las simbiosis endomicorrícicas del resto de los arbustos.

Morte *et al.* (2001) sometieron plantas de *Pinus halepensis*, micorrizadas con el hongo *Suillus mediterraneensis* y no micorrizadas, a un periodo de estrés hídrico de cuatro meses. La sequía inducida afectó al crecimiento de las plantas, y la ectomicorriza no pudo compensar dicho efecto. No obstante, cuando se reestableció la irrigación, los incrementos en altura, número de ramas, biomasa total y contenido en clorofila fueron mayores en las plantas micorrizadas. El descenso en el contenido hídrico del suelo disminuyó el potencial hídrico foliar y la conductancia estomatal en las plantas, aunque esta disminución fue mayor en las plantas no micorrizadas, indicando que la ectomicorriza permitía una mejor captación de agua en el suelo seco.

El comportamiento de plantas de *Pinus pinea* micorrizadas con el hongo *Rhizopogon roseolus* frente a situaciones de estrés hídrico fue distinto. Bajo condiciones de irrigación regular en sustrato artificial, las plantas de *Pinus pinea* micorrizadas con *Rhizopogon roseolus* mostraron crecimientos significativamente mayores que las plantas no inoculadas. No obstante, al someterlas a periodos de estrés hídrico controlados, las plantas micorrizadas no mostraron ningún beneficio, en cuanto a crecimiento, respecto a los controles. Incluso, las plantas con una alta colonización radical se recuperaron más lentamente del estrés hídrico al reestablecer la irrigación (Parladé *et al.*, 2001). Es difícil generalizar el comportamiento que cabe esperar de las plantas micorrizadas; cada combinación planta-hongo-suelo responde de forma distinta, de ahí la importancia de seleccionar los hongos más adecuados (Trappe, 1977).

Micorrización controlada en vivero

El objetivo principal de la aplicación de las técnicas de inoculación con hongos ectomicorrícicos en viveros forestales es la mejora de la calidad de la planta destinada a la repoblación forestal. La introducción de los hongos seleccionados puede realizarse mediante distintas técnicas en función de las características del sistema de producción del vivero y de las especies consideradas. Las técnicas que se han usado con mayor frecuencia para la producción de inóculo consisten en: micelio del hongo crecido en un sustrato enriquecido con solución nutritiva, micelio del hongo encapsulado en polímeros de alginato, o suspensiones de esporas en distintos medios, ya sean sólidos o líquidos (Honrubia *et al.*, 1992; Parladé *et al.*, 1993; Pera *et al.*, 1993).

La formulación del inóculo aplicado influye en la efectividad de la inoculación controlada de las plantas de vivero. Así, utilizando tres tipos de inóculo del hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cok. & Couch [*Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert]: micelio crecido en un sustrato de turba y vermiculita suplementado con medio nutritivo, micelio del hongo encapsulado en un polímero de alginato, y basidiosporas obtenidas de carpóforos recolectados en campo, para la micorrización de *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii* en contenedor (Pera *et al.*, 1994), se demostró que con la aplicación de micelio crecido en sustrato se conseguía micorrizar el 80% de las plantas de *Pinus pinaster* inoculadas, mientras que era totalmente inefectivo para *Pseudotsuga menziesii*; con la encapsulación del micelio del mismo hongo en gel de alginato no se obtuvo ninguna planta micorrizada con ninguna de las dos especies arbóreas; finalmente, la introducción de basidiosporas de *Pisolithus tinctorius* en el sustrato de cultivo fue el método de inoculación que permitió la micorrización de ambas especies vegetales, *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii*, en contenedor.

La utilización de inóculo miceliar (micelio del hongo crecido en algún medio nutritivo) precisa de un sistema de amplificación de este micelio en condiciones axénicas que sea capaz de suministrar la cantidad suficiente para que la aplicación en vivero sea práctica. Existen distintos métodos, ampliamente documentados en la literatura internacional, para la producción de inóculo miceliar con distintas especies fúngicas (Brundrett *et al.*, 1996). No obstante, para integrar la micorrización controlada en la producción viverística forestal se necesitará industrializar un método factible para ob-

tener estos micelios a escala comercial. Esta necesidad no está solucionada, aunque recientemente se han hecho interesantes avances en este terreno. Carrillo *et al.* (2004) probaron distintas condiciones de cultivo con el objetivo de optimizar la producción de micelio de algunos hongos ectomicorrícicos: *Lactarius deliciosus* y *Suillus mediterraneensis*, en biorreactores bajo cultivo aeróbico sumergido, determinando el micelio metabólicamente activo mediante la cuantificación del contenido en ergosterol. El sistema propuesto permite controlar la fermentación dentro del biorreactor y optimizar la producción de este tipo de inóculo.

La dosis a la que se aplique el inóculo fúngico también resultará determinante para la obtención de planta micorrizada con un nivel aceptable de colonización radical. Además, debe conseguirse una dosis de aplicación no demasiado alta, para que su utilización sea económicamente factible. Esta dosificación debe determinarse experimentalmente para las distintas combinaciones planta-hongo, sin olvidar que las condiciones del vivero: sustrato, riego, fertilización..., tienen también un importante papel en la micorrización de las plantas. En España se han estudiado distintas combinaciones hongo-planta; por ejemplo, para la micorrización controlada de *Pinus pinaster* en contenedor con micelio de *Pisolithus tinctorius* se identificó como dosis óptima de aplicación la mezcla de dicho inóculo en una proporción 1:8 con el sustrato de cultivo (1:8, inóculo:sustrato, v:v) (Pera *et al.*, 1994).

La aplicación de preparados de esporas fúngicas, obtenidas a partir de cuerpos fructíferos recolectados en bosques o plantaciones, no precisa de una fase de crecimiento miceliar en cultivo puro y su aplicación en vivero resulta sencilla (Castellano *et al.*, 1985). En muchos casos pueden ser incorporadas al agua usada para la irrigación o mezcladas con el sustrato de cultivo. Frente a esta facilidad de aplicación, este tipo de inóculo presenta algunos inconvenientes, entre ellos, y desde un punto de vista estrictamente práctico, depende de la variabilidad estacional y anual de la fructificación de los hongos en condiciones naturales; además, no es fácil determinar si las esporas que se van a utilizar son viables y capaces de germinar en la rizosfera de las plantas que se pretende inocular, las suspensiones de esporas en agua deben conservarse a baja temperatura (4 °C) durante periodos de tiempo no superiores a 30 días, ya que transcurrido este plazo la viabilidad y actividad de las esporas disminuye considerablemente (Miller *et al.*, 1993; Torres y Honrubia 1994c). Todo ello conlleva di-

ficultades en la disponibilidad y el almacenamiento del inóculo esporal desde la recolección en campo hasta su aplicación en vivero.

Para la utilización de esporas en las prácticas de inoculación de planta en vivero también es aconsejable establecer las dosis óptimas de aplicación. En España, se han realizado estudios para determinar la capacidad de colonización de las esporas de distintas especies fúngicas y el efecto de un rango de distintas concentraciones de dichas esporas en la formación de ectomicorrizas y el crecimiento de los plantones de distintas especies forestales en condiciones de vivero. Torres y Honrubia (1994b) inocularon plantas de *Pinus halepensis*, cultivadas en sustrato desinfectado o no desinfectado, con basidiosporas de *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus collinitus*. Los valores medios más altos, tanto en el crecimiento de la planta (altura, peso seco) como en la proporción de ectomicorrizas en las raíces, se registraron en las plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* en sustrato desinfectado, aunque sin diferencias significativas entre las tres especies fúngicas inoculadas. Parladé *et al.* (1996b) utilizando suspensiones en agua de esporas de distintas especies de hongos ectomicorrícicos, comunes en el nordeste de España, inocularon plantas de *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus pinaster* crecidas en contenedor. Para cada una de las especies fúngicas, elegidas en función de su capacidad para formar la simbiosis con una u otra especie forestal (Pera y Álvarez 1995; Parladé *et al.*, 1996a), se probaron un rango de concentraciones de esporas que variaban entre 10^2 y 10^7 esporas por plántula. Según los resultados obtenidos, concluían que las dosis de aplicación óptimas oscilaban entre 10^5 y 10^6 esporas por planta para especies como *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon subareolatus*, *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum*, mientras que eran mucho menores, del orden de 10^3 esporas por planta, para especies fúngicas como *Tuber maculatum*. La abundancia de esporocarpos de estas especies fúngicas, y la capacidad colonizadora de sus esporas a concentraciones relativamente manejables, permiten usarlas como inóculo ectomicorrícico a gran escala para la micorrización controlada en vivero.

Rincón *et al.* (1997; 2001) abordaron la micorrización controlada de *Pinus pinea*, una especie utilizada para repoblaciones en la zona Mediterránea y cuyo estatus micorrícico no había recibido mucha atención hasta entonces. Para ello, de entre las especies fúngicas que ya se habían descrito como simbioses de *Pinus pi-*

nea (Rincón *et al.*, 1999), probaron siete especies de hongos ectomicorrícicos, para determinar su efectividad en plantas de pino piñonero crecidas en contenedor. *Hebeloma crustuliniforme* y *Laccaria laccata* se aplicaron en forma de inóculo miceliar; *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma verrucosum* se inocularon en forma de preparados a base de esporas. *Pisolithus tinctorius* se aplicó de ambas maneras. Todos los inóculos se probaron a distintas concentraciones. De los hongos inoculados en forma de micelio, *Hebeloma crustuliniforme* mostró la capacidad infectiva más elevada, y entre los inoculados en forma de esporas, los porcentajes de raíces micorrizadas más altos correspondían a ambas especies de *Rhizopogon*, aunque se obtuvieron plantas micorrizadas con todos los hongos probados.

González-Ochoa *et al.* (2003) inocularon plantas de *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster*, en dos viveros del sudeste español, aplicando inóculos, ya fuera en suspensiones esporales o en forma de micelio, de siete especies distintas de hongos ectomicorrícicos: *Pisolithus tinctorius*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Suillus mediterraneensis*, *Suillus collinitus*, *Suillus bellini*, y *Rhizopogon roseolus*, en dos tipos distintos de sustrato para el crecimiento de las plantas: corteza de pino compostada, o turba-vermiculita fertilizada. Los resultados apuntaban diferencias significativas entre ambos tipos de sustrato, siendo, en general, la turba-vermiculita fertilizada el sustrato en el que se obtenían los mejores resultados. Adicionalmente, se demostraba que el nivel de micorrización obtenido dependía claramente de la especie fúngica inoculada y, para cada especie, del tipo de inóculo utilizado.

Duñabeitia *et al.* (2004a) inocularon plantas de *Pinus radiata*, producidas en un vivero de contenedor, con suspensiones de esporas de tres especies ectomicorrícicas: *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum* (10^6 - 10^7 esporas / planta). El efecto de la micorrización sobre el crecimiento de *Pinus radiata* dependía de la especie fúngica inoculada; las plantas micorrizadas con *Rhizopogon roseolus* mostraron un crecimiento de su parte aérea significativamente mayor que las plantas no micorrizadas. No obstante, los tres hongos inducían un incremento significativo de la biomasa radical, en comparación con las plantas control no inoculadas, y mejoraban el estado fisiológico de las plantas de vivero: aumentando la actividad enzimática radical, el contenido en nutrientes, la fotosíntesis neta y la eficiencia en el uso del agua. De

las tres especies fúngicas, *Rhizopogon roseolus* fue la más efectiva. Esta especie fúngica también ha demostrado una alta adaptabilidad y tolerancia a condiciones ambientales adversas (Duñabeitia *et al.*, 2004a).

Una correcta dosificación del inóculo no sólo es necesaria para que la aplicación comercial de la micorrización controlada en vivero sea económicamente viable, sino que puede permitir la combinación de más de una especie fúngica para obtener plantas asociadas simbióticamente con distintos hongos al mismo tiempo (Parladé y Álvarez, 1993); una situación más parecida al estado micorrícico normal de los árboles en condiciones naturales. Parladé *et al.* (1999a) consiguieron la coinoculación de plantas de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) y pino marítimo (*Pinus pinaster*) con micelio de *Laccaria bicolor* y esporas de *Rhizopogon* spp. encapsuladas en gel de alginato. Variando las proporciones de micelio y esporas, de uno y otro hongo en la mezcla de inóculos, se conseguían plantas con micorrizas de ambas especies fúngicas en su sistema radical.

La inoculación de las raíces de una planta con más de un microorganismo, con esperados efectos beneficiosos para el vegetal, se ha ensayado también combinando hongos ectomicorrícicos y bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. Probanza *et al.* (2001) inocularon plantas de *Pinus pinea* con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* y bacterias del género *Bacillus* (*B. licheniformis* y *B. pumilus*). Ambas bacterias promovían el crecimiento de *Pinus pinea* sin ningún efecto sinérgico con la micorrización. La introducción de ambos inóculos, bacterias y hongo, causó una alteración en la composición microbiana de la rizosfera. Domenech *et al.* (2004) coinocularon plantas de *Quercus ilex* spp. *ballota* con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) del género *Bacillus* sin efectos positivos sobre el crecimiento de la planta. Rincón *et al.* (2005) coinocularon plántulas de *Pinus halepensis* con el hongo ectomicorrícico *Suillus granulatus* y la bacteria *Pseudomonas fluorescens* Aur6-GFP. La presencia de *Suillus granulatus* estimulaba significativamente la persistencia de la bacteria en la zona de elongación radical, donde la colonización fúngica era más alta. La formación de micorrizas no fue afectada por la coinoculación con la bacteria Aur6-GFP, pero se demostró un efecto sinérgico sobre el crecimiento de las plantas cuando se coinoculaban el hongo y la bacteria.

Las técnicas de micorrización controlada se han aplicado también al enraizamiento de estaquillas de distintas especies forestales. Estos experimentos permitieron determinar el efecto positivo de la inoculación del sustrato de enraizamiento con hongos como: *Laccaria bicolor*, *Melanogaster ambiguus* o *Rhizopogon subareolatus*, sobre el enraizamiento y la micorrización de estaquillas de abeto de Douglas (Parladé *et al.*, 1997b; Parladé *et al.*, 1999b).

Del mismo modo se han desarrollado las técnicas necesarias para la micorrización controlada de plantas obtenidas por reproducción *in vitro*. Así, Díez *et al.* (2000), inocularon plántulas de *Quercus suber* obtenidas de embriones somáticos con distintas cepas de *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma polyrhizum*. Dicha inoculación controlada facilitaba el desarrollo de raíces secundarias y la adaptación *ex vitro* de estas plantas.

No sólo las especies arbóreas han sido micorrizadas en condiciones de vivero, sino que especies arbustivas formadoras de ectomicorizas también se han inoculado con éxito: *Cistus ladanifer* con el hongo *Laccaria laccata* (Torres *et al.*, 1995), *Cistus albidus* con *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma verrucosum* (Alguacil *et al.*, 2003; Caravaca *et al.*, 2005), o *Quercus coccifera* con *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma verrucosum* (Maestre *et al.*, 2002; Alguacil *et al.*, 2003; Caravaca *et al.*, 2005).

La incorporación de las técnicas de micorrización controlada en las prácticas habituales de la producción viverística forestal necesitará de la adaptación, no sólo a la planta, sino también al hongo, de todos los procesos culturales implicados (Honrubia *et al.*, 1997a); entre otros: la elección de los sustratos utilizados para el crecimiento de las plantas (Rincón *et al.* 1997; González-Ochoa *et al.*, 2003), los riegos y fertilizaciones aportadas a las plantas (Honrubia *et al.*, 1997b; Hormilla *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 1997), y los tratamientos fitosanitarios aplicados. Algunos de estos aspectos, como el efecto de fungicidas y herbicidas no han recibido aun la atención necesaria, aunque ya disponemos de algunos datos importantes. Díaz *et al.* (2003) determinaron el efecto de distintos fungicidas y herbicidas, aplicados en los viveros forestales, sobre el crecimiento micelial de distintas cepas de dos hongos ectomicorrícicos: *Lactarius deliciosus* y *Pisolithus tinctorius*. Fungicidas como hymexazol o iprodiona presentaban un gran efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las distintas cepas fúngicas. Benomyl, captan y thiram, frecuentemente utilizados en todo tipo de cultivos, reducían el

crecimiento micelial de estos hongos para concentraciones por encima de 100 µg/g. En contraste, los herbicidas: glifosato, simazina y hexacinona, producían poco o ningún efecto sobre el desarrollo de los hongos, e incluso podían estimular el crecimiento de *Lactarius deliciosus*. Otros trabajos de investigación (González-Moro *et al.*, 2000) demostraron que *Laccaria bicolor*, un hongo ectomicorrícico bien conocido y utilizado en toda Europa, es tolerante al herbicida fosfotricina (PPT).

Planta micorrizada, efectos sobre los procesos de repoblación y revegetación

En 1988 se establecieron, en Caldas de Reis (Galicia) y en Arbúcies (Cataluña), plantaciones experimentales con plantones de abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), producidos a raíz desnuda, e inoculados, dos años antes de su trasplante a campo, con la cepa S238 de *Laccaria bicolor* (Le Tacon *et al.*, 1992; Álvarez *et al.*, 1994a). Las plantas control estaban micorrizadas principalmente por *Thelephora terrestris* y *Suillus* sp., hongos ectomicorrícicos dominantes en los dos viveros de procedencia. Los resultados obtenidos en dicha plantación, mostraron que, incluso en un suelo fértil y con una elevada presencia de inóculo ectomicorrícico natural, el estado micorrícico adquirido en el vivero continuaba influenciando el crecimiento de los árboles después del trasplante, tanto en el caso de las plantas micorrizadas por el hongo inoculado, como para las plantas infectadas por la micoflora natural del vivero. Este resultado, corroborado en otras plantaciones experimentales de toda Europa (Le Tacon *et al.*, 1992), evidenciaba la necesidad de un mejor manejo de los hongos ectomicorrícicos durante la fase de crecimiento de la planta en vivero.

La receptividad de un suelo forestal a una asociación micorrícica se ha definido como su capacidad para permitir el desarrollo de la micorriza establecida en la planta huésped antes de su trasplante a campo, generalmente durante la producción en vivero. Esta receptividad no depende sólo de las características físico-químicas del suelo, sino que depende tanto del nivel inicial de micorrización en la planta como del nivel de competencia de la microflora nativa del suelo receptor, y puede estimarse mediante bioensayos en condiciones controladas (Perrin *et al.*, 1994; Perrin *et al.*, 1996). Los

resultados obtenidos mostraron que la flora microbiana de los suelos juega un papel importante en su receptividad. Los bioensayos realizados para una asociación planta-hongo en un rango de distintos suelos forestales, representativos de la variabilidad de una región, por ejemplo, permiten determinar la competencia ecológica del hongo ectomicorrícico.

En 1991 se estableció, en el sudeste español, una parcela experimental con plantas de *Pinus halepensis* inoculadas con *Pisolithus tinctorius*, *Suillus collinitus* y *Rhizopogon roseolus* (Roldán y Albaladejo, 1994). En dicho trabajo se demostró que la micorrización de las plántulas, y su combinación con una enmienda del suelo mediante el aporte de compost de residuos urbanos, mejora la captación de nutrientes, especialmente el fósforo, y el crecimiento de *Pinus halepensis* en suelos áridos. Los efectos más notables se obtuvieron con las plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* y *Suillus collinitus*, confirmando la necesidad de estudios de estas características para llegar a seleccionar los hongos más adecuados para cada especie vegetal y condiciones ambientales.

En 1992 Roldán *et al.* (1996a) establecieron plantaciones de *Pinus halepensis* inoculados con *Pisolithus tinctorius* en zonas de suelos muy degradados en el sudeste de la península, aplicando distintos sistemas de preparación del terreno y enmendados con distintos aportes, entre ellos, residuos urbanos sólidos. La inoculación con *Pisolithus tinctorius* incrementó significativamente el crecimiento de los pinos, tanto en las parcelas donde se había aportado el enmendante como en las que no se había realizado tal aporte. En estas parcelas, el efecto del hongo ectomicorrícico podía estar más relacionado con la capacidad del hongo para estimular la captación de agua, o la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, que con un incremento en la captación de nutrientes, más influenciado por la incorporación de enmiendas orgánicas. Los autores concluían que la combinación entre el aterrazado del suelo, el aporte de residuos orgánicos y la inoculación con *Pisolithus tinctorius* mejoraban el comportamiento de *Pinus halepensis*, y podía ofrecer una metodología aplicable a mejorar la forestación de zonas semiáridas y degradadas (Roldán *et al.*, 1996a; Roldán *et al.*, 1996b; Roldán *et al.*, 1997; Querejeta *et al.*, 1998). En estas plantaciones, establecidas en las condiciones semiáridas del sudeste español, también se pudo comprobar que la micorrización de las plantas y la aportación de enmiendas orgánicas al suelo influía positivamente en

la actividad microbiana de dichos suelos: biomasa microbiana, respiración basal, cociente metabólico y actividades enzimáticas. Los mejores resultados se obtenían cuando la micorrización de *Pinus halepensis* se complementaba con enmiendas orgánicas (García *et al.*, 2000). Del mismo modo, la combinación del aporte de residuos orgánicos y la micorrización de las plantas, en este caso *Pinus halepensis* con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius*, mejoraba significativamente la estabilidad de los agregados y la recuperación de la estructura del suelo, indispensable para el éxito de la forestación en ambientes semiáridos. El efecto beneficioso sobre la estructura del suelo puede ser debido a la reactivación de la actividad microbiana en los mismos (Caravaca *et al.*, 2002). Por el contrario, en estudios realizados para la reforestación de estos ecosistemas mediterráneos semiáridos del sudeste español con *Pinus halepensis*, la inoculación de las plantas en vivero con el hongo ectomicorrícico *Suillus collinitus* no mejoraba el crecimiento de las plantas (Barberá *et al.*, 2005).

La utilización de planta micorrizada puede jugar un importante papel en la reforestación de otras zonas fuertemente alteradas, como por ejemplo zonas afectadas por incendios forestales en las que la regeneración natural es muy baja o nula. En esta línea, en el sudeste español, en la Sierra de Alcaraz, De las Heras *et al.* (2002) establecieron parcelas experimentales para la recuperación de zonas quemadas utilizando plantas de *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster* micorrizadas en vivero (González-Ochoa *et al.*, 2003). Respecto a la supervivencia de las plantas en dichas repoblaciones, los autores concluyen que la micorrización de ambos pinos con hongos ectomicorrícicos pertenecientes a los géneros *Lactarius* y *Suillus* (*Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Suillus collinitus*, *Suillus mediterraneensis*) incrementa la supervivencia media de los plantones.

En otros tipos de suelos con características especiales desde el punto de vista forestal, como son los suelos agrícolas abandonados, también se ha determinado el papel que puede jugar la micorrización controlada de las plantas en el vivero. En este sentido, durante 1997 y 1998 se establecieron una serie de plantaciones experimentales en antiguos suelos agrícolas, de la provincia de Barcelona, para evaluar el efecto de la inoculación micorrícica sobre el comportamiento en campo de plantones de *Pinus pinea* y *Pinus halepensis* (Parladé *et al.*, 2004). Las plantas, producidas en contenedor y usando dos tipos distintos de sustrato, se inocularon

con esporas de *Rhizopogon luteolus* y *Rhizopogon roseolus*. La inoculación con *Rhizopogon roseolus* incrementó la supervivencia de *Pinus pinea* en un 20% en comparación con las plantas no inoculadas.

Los efectos positivos de la inoculación con hongos ectomicorrícicos sobre la revegetación de zonas degradadas o alteradas también se han demostrado para especies vegetales no arbóreas, como *Cistus albidus* (Alguacil *et al.*, 2003; Caravaca *et al.*, 2005) y *Quercus coccifera* (Maestre *et al.*, 2002; Alguacil *et al.*, 2003; Caravaca *et al.*, 2005), y en los mismos tipos de suelos. En el sudeste español, en la región de Murcia, se han establecido experimentos de campo para determinar la efectividad de tratamientos combinados que incluían: la micorrización de las plantas en vivero, y el aporte al suelo de plantación de residuos orgánicos tratados y fuentes de nutrientes minerales. Los experimentos realizados demostraron que la micorrización con *Pisolithus tinctorius* tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas de *Cistus albidus* en campo. El crecimiento de las plantas de *Cistus albidus* micorrizadas era el 130% mayor que el de las plantas control (Alguacil *et al.*, 2003). Del mismo modo, la micorrización con *Scleroderma verrucosum* también estimulaba el crecimiento de *Cistus albidus* (470% con respecto a las plantas control) y *Quercus coccifera* (74% respecto a las plantas control) (Caravaca *et al.*, 2005). La combinación de tratamientos, micorrización y enmienda del suelo con residuos orgánicos, no presentaba efectos aditivos sobre el crecimiento de ambas especies arbustivas. La inoculación con hongos ectomicorrícicos mejoraba también algunas de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo, especialmente en la rizosfera de *Quercus coccifera*, aunque las características edáficas se veían más influenciadas por la adición de enmendantes orgánicos al suelo.

Parladé *et al.* (1997a) recopilaron los resultados obtenidos en las plantaciones experimentales establecidas en el norte peninsular (Galicia, País Vasco y Cataluña) con plantas de *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus pinaster* y *Pinus pinea*, crecidas en vivero tanto a raíz desnuda como en contenedor, y micorrizadas con distintas especies fúngicas: *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Melanogaster ambiguus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon colossus*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus*, *Rhizopogon subareolatus*, o *Scleroderma verrucosum* (Álvarez *et al.*, 1994a; 1994b; Duñabeitia *et al.*, 1994). Estos ensayos realizados en el norte de España, tanto en suelos típicamente forestales como en suelos

agrícolas abandonados, mostraron que el crecimiento de los plantones trasplantados se podía mejorar mediante una micorrización controlada en vivero con especies fúngicas como *Laccaria bicolor* o *Melanogaster ambiguus*, incluso en suelos con un inóculo natural competitivo.

En las plantaciones experimentales establecidas en el norte de España, para determinar el efecto de diferentes hongos ectomicorrícicos sobre el crecimiento y la supervivencia de *Pseudotsuga menziesii* en condiciones de campo (Pera *et al.*, 1997), se demostró que la inoculación ectomicorrícica tenía un efecto muy limitado sobre la supervivencia de estas plantas después del trasplante, siendo sólo significativa si se comparaba con la supervivencia obtenida con las plantas que se hicieron crecer en un vivero sin inocular y en suelo no desinfectado. *Laccaria bicolor* S238 presentó un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas en viveros a raíz desnuda, y estas diferencias se mantenían tras su trasplante a campo. La inoculación en vivero con hongos ectomicorrícicos como *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon colossus* y *Rhizopogon subareolatus* mejoraba el crecimiento de las plantas durante los dos o tres primeros años después del trasplante a campo, y los efectos positivos de los tratamientos de inoculación sobre la altura de las plantas, o el diámetro del tronco, persistían después de cinco años de crecimiento en plantación. La inoculación con estos hongos ectomicorrícicos mejoraba el comportamiento en campo del abeto de Douglas (Pera *et al.*, 1999).

Pinus radiata ha sido otra de las especies con las que se han establecido varias plantaciones experimentales en el norte de la península para determinar el efecto de la inoculación con hongos ectomicorrícicos seleccionados (Duñabeitia *et al.*, 1996) sobre el establecimiento de masas forestales. Las inoculaciones de *Pinus radiata*, en vivero de contenedor, con *Rhizopogon roseolus*, *Rhizopogon luteolus* y *Scleroderma citrinum*, han mejorado el crecimiento de los árboles en plantación durante los años siguientes a su trasplante a campo, particularmente en zonas con una menor pluviometría (Ortega *et al.*, 2004), o en suelos que presentaban condiciones limitantes para el crecimiento de la planta (Pascual *et al.*, 2001).

La inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos se suele realizar durante la fase de crecimiento de la planta en vivero; no obstante, y aunque en menor medida, existen referencias que demuestran que la introducción de distintos hongos ectomicorrícicos se puede

obtener mediante la inoculación directa en campo. En este sentido, Duñabeitia *et al.* (2001; 2004b) publicaron los resultados obtenidos en experimentos de inoculación en campo en el Parque Natural de Urkiola (País Vasco). Así, inocularon plantas de *Fagus sylvatica*, *Quercus pyrenaica*, *Sorbus aucuparia* y *Betula celtiberica*, ya establecidas en campo entre dos y seis meses antes, mediante el riego con una suspensión de esporas de las especies ectomicorrícicas *Scleroderma citrinum* y *Scleroderma verrucosum*, para las tres primeras, y *Lactarius blumii* para el abedul. Las plantas inoculadas mostraban mejoras significativas en los parámetros medidos, tanto biométricos como fisiológicos. En otro experimento, inocularon hayas (*Fagus sylvatica*), robles (*Quercus pyrenaica*) y abedules (*Betula celtiberica*), de un año, con esporas de *Scleroderma citrinum*, *Pisolithus tinctorius* o *Leccinum scabrum* tras su trasplante a campo. Las inoculaciones con *Scleroderma citrinum*, en el caso de robles y hayas, y *Leccinum scabrum* en el de los abedules, mejoraban significativamente el crecimiento de las plantas y su estado fisiológico. Los resultados en estos experimentos de campo demostraban que las basidiosporas de distintos hongos ectomicorrícicos podían inocularse en campo, poco después del trasplante de los plantones, y obtener la micorrización de las raíces de hayas, robles y abedules, abriendo con ello nuevas posibilidades de aplicabilidad práctica.

Conclusiones

En los últimos 25 años, se ha realizado un importante avance en el conocimiento de los hongos ectomicorrícicos asociados a las especies, tanto autóctonas como introducidas, comunes en los bosques de las distintas zonas ecológicas españolas. La mayoría de los trabajos de investigación se han centrado en las coníferas de interés forestal, especialmente del género *Pinus*, y han implicado a distintas especies fúngicas, estudiadas también en profundidad a nivel internacional, como: *Pisolithus tinctorius*, o especies de los géneros *Hebeloma*, *Laccaria*, *Rhizopogon*, *Suillus* o *Scleroderma*.

Las técnicas de producción y aplicación de distintos tipos de inóculos de hongos ectomicorrícicos se han desarrollado y adaptado para las principales especies utilizadas en proyectos de repoblación o revegetación, y a las condiciones de nuestros viveros.

Los resultados obtenidos con las plantas micorrizadas en vivero, y referidos en el presente trabajo, han

mostrado efectos positivos en determinados suelos y condiciones ambientales, como son: la introducción de especies exóticas de rápido crecimiento en zonas forestales productivas, la reforestación de zonas agrarias abandonadas, o la revegetación de suelos áridos con árboles y arbustos típicos de la zona Mediterránea. En estas situaciones, los resultados publicados demuestran que la utilización de planta micorrizada con hongos seleccionados mejora la supervivencia y el crecimiento de las plantas tras su trasplante a campo.

Las técnicas de micorrización controlada, especialmente con inóculos a base de esporas, están suficientemente desarrolladas y adaptadas a nuestras condiciones como para que la inoculación con algunos hongos seleccionados pueda convertirse en una práctica habitual en los viveros forestales.

Bibliografía

- ALGUACIL M.M., CARAVACA F., AZCÓN R., PERA J., DÍAZ G., ROLDÁN A., 2003. Improvements in soil quality and performance of mycorrhizal *Cistus albidus* L. seedlings resulting from addition of microbially treated sugar beet residue to a degraded semiarid Mediterranean soil. *Soil Use and Management* 19: 277-283.
- ÁLVAREZ I.F., 1991. Ecología, fisiología e implicaciones prácticas de las ectomicorrizas. En: Olivares J., Barea JM (eds). Fijación y movilización biológica de nutrientes, vol. II. Fijación de nitrógeno y micorrizas. CSIC/Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, pp. 247-259.
- ÁLVAREZ I.F., PARLADÉ J., PERA J., ESPINEL S., BOUCHARD D., LE TACON F., 1994a. Performance of bare-root Douglas-fir seedlings inoculated with *Laccaria bicolor* S-238 five years after field outplanting. En: Azcón-Aguilar C., Barea J.M. (eds). Mycorrhizas in integrated systems. From genes to plant development. Published by the European Commission, Brussels, Luxemburg, 1996. pp. 417-419.
- ÁLVAREZ I.F., DUÑABEITIA M., ESPINEL S., HORMILLA S., PARLADÉ J., PEÑA J.I., PERA J., 1994b. Field performance of containerized Douglas-fir seedlings inoculated with three hypogeous fungi. En: Azcón-Aguilar C., Barea J.M. (eds). Mycorrhizas in integrated systems. From genes to plant development. Published by the European Commission, Brussels, Luxemburg, 1996. pp. 413-416.
- BARBERÁ G.G., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ F., ÁLVAREZ-ROGEL J., ALBALADEJO J., CASTILLO V., 2005. Short- and intermediate-term effects of site and plant preparation techniques on reforestation of a Mediterranean semiarid ecosystem with *Pinus halepensis* Mill. *New Forest* 29: 177-198.

- BARKER S.J., TAGU D., 2000. The role of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J Plant Growth Regul* 19: 144-154.
- BRUNDRETT M., BOUGHER N., DELL B., GROVE T., MALAJCZUK N., 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph, 32. Canberra, Australia. 374 pp.
- CARAVACA F., GARCÍA C., HERNÁNDEZ M.T., ROLDÁN A., 2002. Agrégate stability changes after organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halepensis*. *Applied Soil Ecology* 19: 199-208.
- CARAVACA F., ALGUACIL M.M., AZCÓN R., PARLADÉ J., TORRES P., ROLDÁN A., 2005. Establishment of two ectomycorrhizal shrub species in a semiarid site after in situ amendment with sugar beet, rock phosphate, and *Aspergillus niger*. *Microbial Ecology* 49: 73-82.
- CARRILLO C., DÍAZ G., HONRUBIA M., 2004. Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content. *Eng Life Sci* 4 (1): 43-45.
- CASTELLANO M.A., TRAPPE J.M., MOLINA R., 1985. Inoculation of container-grown Douglas-fir seedlings with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. *Can J For Res* 15: 10-13.
- COMISIÓN ECONÓMICA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EUROPA, 2004. Estado de los bosques en Europa. Informe Ejecutivo 2004. CEPE, Ginebra. 49 pp. ISSN 1020-587X.
- DE LAS HERAS J., BERZOSA A., HONRUBIA M., TORRES P., DÍAS G., SANCHEZ F., 1997. Efectos de fuegos experimentales sobre la población de esclerocios de *Cenococcum* sp. en pinares de *Pinus halepensis*. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo V. pp. 133-137.
- DE LAS HERAS J., GONZÁLEZ-OCHOA A.I., TORRES P., 2002. Afforestation of burnt forests using mycorrhized *Pinus halepensis* and *P. pinaster* saplings. En: Trabaud L., Prodon R. (eds). Fire and Biological Processes. Backhuy Publishers, Leiden, The Netherlands. pp. 255-263.
- DE ROMÁN M., DE MIGUEL A.M., 2002. Post-fire dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* subs. *ballota* forest. En: Trabaud L., Prodon R. (eds). Fire and Biological Processes. Backhys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp. 131-136.
- DÍAZ G., HONRUBIA M., 1994. A mycorrhizal survey of plants growing on mine wastes in southeast Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 8: 59-68.
- DÍAZ G., BARRANTES O., HONRUBIA M., GRACIA C., 1996. Effects of ozone and sulphur dioxide on mycorrhizae of *Pinus halepensis* Miller. *Ann Sci For* 53: 849-856.
- DÍAZ G., CARRILLO C., HONRUBIA M., 2003. Differential response of ectomycorrhizal fungi to pesticides in pure culture. *Cryptogamie Mycologie* 24 (3): 199-211.
- DÍEZ J., MANJÓN J.L., KOVÁCS G.M., CELESTINO C., TORIBIO M., 2000. Mycorrhization of vitroplants raised from somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.). *Applied Soil Ecology* 15: 119-123.
- DOMENECH J., RAMO-SOLANO B., PROBANZA A., LUCAS-GARCÍA J.A., COLÓN J.J., GUTIÉRREZ-MANERO F.J., 2004. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 194: 293-303.
- DUÑABEITIA M.K., HORMILLA S., PEÑA J.I., 1994. Effect of inoculation with *Laccaria bicolor* on drought tolerance and field outplanting of Douglas-fir seedlings. En: Azcón-Aguilar C., Barea J.M. (eds). Mycorrhizas in integrated systems. From genes to plant development. Published by the European Commission, Brussels, Luxemburg, 1996. pp. 424-427.
- DUÑABEITIA M.K., HORMILLA S., SALCEDO I., PEÑA J.I., 1996. Ectomycorrhizae synthesized between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. *Mycologia* 88: 897-908.
- DUÑABEITIA M.K., GARTZIA M., RODRÍGUEZ N., SARRIONANDIA E., SALCEDO I., 2001. Influencia de la micorrización en el establecimiento y desarrollo de una plantación de frondosas (Parque Natural de Urkiola). III Congreso Forestal Español. Granada. Montes para la Sociedad del Nuevo Milenio. Tomo 6, pp. 248-253.
- DUÑABEITIA M.K., HORMILLA S., GARCÍA-PLAZAOLA I., TXARTERINA K., ARTECHE U., BECERRIL J.M., 2004a. Differential response of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14: 11-18.
- DUÑABEITIA M., RODRÍGUEZ N., SALCEDO I., SARRIONANDIA E., 2004b. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque Country. *Forest Ecology and Management* 195: 129-139.
- FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN F.J., RODRÍGUEZ A., 1992.. El fuego y la respuesta de los macromicetos del suelo en pinares de *Pinus pinaster* Ait. *Invest Agrar Sist Recur For* 1: 137-150.
- GARCÍA C., HERNÁNDEZ T., ROLDÁN A., ALBALA-DEJO 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: 1173-1181.
- 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. *Ann For Sci* 60: 43-48.
- GONZÁLEZ-MORO M.B., IRIBERRI N., DUÑABEITIA M.K., LOUREIRO-BELDARRAIN I. GONZÁLEZ-MURUA C. 2000. Effect of phosphinothricin herbicide on nitrogen metabolism in *Pinus radiata* and *Laccaria bicolor*. *Phyton (Austria) Special Issue: «Root-soil interactions»* 40: 71-77.
- HARLEY J.L., SMITH S.E., 1983. Mycorrhizal simbiosis. New York, Academic Press. 483 pp.
- HATCH A.B., 1937. The physiological basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. *Black Rock For Bull* 6, 168 pp.

- HONRUBIA M., 2000. Mycorrhizas in *Pinus halepensis* Miller. En: Ne'eman G., Trabaud L. (eds). Ecology, Biogeography and Management of *Pinus halepensis* and *P. brutia* Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 191-202.
- HONRUBIA M., DÍAZ G., 1996. Effect of simulated acid rain on mycorrhizae of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller) in calcareous soil. *Ann Sci For* 53: 947-954.
- HONRUBIA M., TORRES P., DÍAZ G., CANO A., 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA.
- HONRUBIA M., TORRES P., DÍAZ G., MORTE A., 1995. Biotecnología Forestal: Micorrización y micropropagación de plantas. Universidad de Murcia, Murcia, 86 pp.
- HONRUBIA M., DÍAZ G., GUTIÉRREZ A., 1997a. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 301-306.
- HONRUBIA M., CARRILLO C., PEÑUELAS J., DOMÍNGUEZ S., VILLAR P., OCAÑA L., 1997b. Influencia de la fertirrigación en la micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 307-311.
- HORMILLA S., PEÑA J.I., DUÑABEITIA M.K., 1997. Influencia de la ectomicorrización en la respuesta de plantas de *Quercus robur* L. a la deficiencia nutricional. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 313-318.
- LANSAC A.R., MARTÍN A., ROLDÁN A., 1995. Mycorrhizal colonization and drought interactions of Mediterranean shrubs under greenhouse conditions. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 9: 167-175.
- LE TACON F., ALVAREZ I.F., BOUCHARD D., HENRION B., JACKSON R.M., LUFF S., PARLADÉ J., PERA J., STENSTRÖM E., VILLENEUVE N., WALKER C., 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. En: Read, D.H., Lewis, D.H., Fitter, A.H. and Alexander, J.L. (eds.) Mycorrhizas in Ecosystems. C.A.B. International. pp. 119-134.
- MARKS G.C., KOZLOWSKI T.T., 1973. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. Academic Press, New York & London. 444 pp.
- MAESTRE F.T., BAUTISTA S., CORTINA J., DÍAZ G., HONRUBIA M., VALLEJO R., 2002. Microsite and mycorrhizal inoculum effects on the establishment of *Quercus coccifera* in a semi-arid degraded steppe. *Ecological Engineering* 19: 289-295.
- MILLER S.L., TORRES P., McLEAN T.M., 1993. Basidiospore viability, dormancy, activation and germination in ectomycorrhizal and saprophytic basidiomycetes. *Mycol Res* 97, 141-149.
- MITCHELL H.L., FINN R.F., ROSENDAHL R.O., 1937. The relation between mycorrhizae and the growth and nutrient absorption of coniferous seedlings in nursery beds. *Black Rock For Pap*, 1: 57-73.
- 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.
- ORTEGA U., DUÑABEITIA M., MENÉNDEZ S., GONZÁLEZ-MURUA C., MAJADA J., 2004. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. *Tree Physiology* 24: 65-73.
- PARDOS J.A., 1962. Estudio sobre micorrizas en pinos. *Anales del Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias*, n.º 7, págs. 141-176.
- PARLADÉ J., ÁLVAREZ I.F., 1993. Coinoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3: 93-96.
- PARLADÉ J., PERA J., ÁLVAREZ I.F., 1993. Técnicas de inoculación de plantas de repoblación con hongos ectomycorrízicos seleccionados. I Congreso Forestal Español, Lourizan junio de 1993. Ponencias y comunicaciones. Tomo III. pp. 385-389.
- PARLADÉ J., ÁLVAREZ I.F., PERA J., 1996a. Ability of native ectomycorrhizal fungi from northern Spain to colonize Douglas-fir and other introduced conifers. *Mycorrhiza* 6: 51-55.
- PARLADÉ J., PERA J., ÁLVAREZ I.F., 1996b. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 237-245.
- PARLADÉ J., PERA J., ÁLVAREZ I.F., 1997a. La micorrización contrôlée du Douglas dans le nord de l'Espagne: premières résultats en plantation. *Rev For Fr* 49: 163-173.
- PARLADÉ J., PERA J., ÁLVAREZ I.F., 1997b. Efecto de la inoculación y del método de desinfección del sustrato en el enraizamiento y la formación de ectomicorrizas en estaquillas de abeto de Douglas. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona, junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 497-502.
- PARLADÉ J., ÁLVAREZ I.F., PERA J., 1999a. Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 8: 189-195.
- PARLADÉ J., PERA J., ÁLVAREZ I.F., BOUCHARD D., GÉNÉRÉ B., LE TACON F., 1999b. Effect of inoculation and substrate disinfection method on rooting and ectomycorrhiza formation of Douglas fir cuttings. *Ann For Sci* 56: 35-40.
- PARLADÉ J., COHEN M., DOLTRA J., LUQUE J., PERA J., 2001. Continuous measurement of stem-diameter growth response of *Pinus pinea* seedlings mycorrhizal with *Rhizopogon roseolus* and submitted to two water regimes. *Mycorrhiza* 11: 129-136.
- PARLADÉ J., LUQUE J., PERA J., RINCÓN A.M., 2004. Field performance of *Pinus pinea* and *P. halepensis* seed-

- lings inoculated with *Rhizopogon* spp. and outplanted in formerly arable land. *Ann For Sci* 61: 507-514.
- PASCUAL M.T., DUÑABEITIA M.K., MAJADA J., ESPINEL S., RODRÍGUEZ N., ORTEGA U., TXARTERINA K., 2001. Resultados preliminares del comportamiento en campo de procedencias seleccionadas de *Pinus radiata*: efecto de la micorrización en condiciones desfavorables de crecimiento. III Congreso Forestal Español. Granada. Montes para la Sociedad del Nuevo Milenio, Tomo 3, pp. 278-284.
- PERA J., ÁLVAREZ I.F., 1995. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*. *Mycorrhiza* 5: 193-200.
- PERA J., ÁLVAREZ I.F., PARLADÉ J., 1993. Selección de hongos ectomicorrícicos para *Pinus pinaster* Ait. I Congreso Forestal Español, Lourizan junio de 1993. Ponencias y comunicaciones. Tomo III. pp. 391-396.
- PERA J., PARLADÉ J., 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*, 3 (1): 19-29.
- PERA J., PARLADÉ J., ÁLVAREZ I.F., 1997. Supervivencia y crecimiento en plantación de abeto de Douglas inoculado con hongos ectomicorrícicos. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 503-508.
- PERA J., ÁLVAREZ I.F., RINCÓN A., PARLADÉ J., 1999. Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9: 77-84.
- PERRIN R., PERA J., PARLADÉ J., 1994. Réceptivité des sols forestiers à l'association ectomycorrhizienne. Application à la définition de la compétence écologique de souches sélectionnées. *Acta Bot Gallica*, 141 (4): 541-545.
- PERRIN R., PARLADÉ J., PERA J., 1996. Receptiveness of forest soils to ectomycorrhizal association: I. Concepts and methods as applied to the symbiosis between *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Pinus pinaster* Ait or *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Mycorrhiza* 6: 469-476.
- PERRY D.A., MOLINA R., AMARANTHUS M.P., 1987. Mycorrhizae, mycorrhizospheres, and reforestation: current knowledge and research needs. *Can J For Res* 17: 929-940.
- PROBANZA A., MATEOS J.L., GARCÍA J.A.L., RAMOS B., DE FELIPE M.R., MANERO F.J.G., 2001. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. *Microbial Ecology* 41: 140-148.
- QUEREJETA J.I., ROLDÁN 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*. *Forest Science* 44 (2): 203-211.
- RINCÓN A., ÁLVAREZ I.F., PARLADÉ J., PERA J., 1997. Micorrización controlada de *Pinus pinea* en vivero. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 545-550.
- RINCÓN A., ÁLVAREZ I.F., PERA J., 1999. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northern Spain. *Mycorrhiza* 8: 271-276.
- RINCÓN A., ÁLVAREZ I.F., PERA J., 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265-271.
- RINCÓN A., RUIZ-DÍEZ B., GARCÍA-FRAILE S., LUCAS-GARCÍA J.A., FERNÁNDEZ-PASCUAL M., PUEYO J.J., DE FELIPE M.R., 2005. Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 303-311.
- RODRÍGUEZ-BARREAL J.A., SÁIZ DE OMEÑACA J.A., ZAZO J., DE SIMÓN J.A., DE SIMÓN E., 1994. Protective reforestation with mycorrhizal *Pinus halepensis* Mill. in Almería (Spain). En: Azcón-Aguliar C., Barea J.M. (eds). *Mycorrhizas in integrated systems. From genes to plant development*. Published by the European Commission, Brussels, Luxemburg, 1996. pp. 581-584.
- ROLDÁN A., ALBALADEJO J., 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biol Fertil Soils* 18: 143-149.
- ROLDÁN A., QUEREJETA I., ALBALADEJO J., CASTILLO V., 1996a. Growth response of *Pinus halepensis* to inoculation with *Pisolithus arhizus* in a terraced rangeland amended with urban refuse. *Plant and Soil* 179: 35-43.
- ROLDÁN A., QUEREJETA I., ALBALADEJO J., CASTILLO V., 1996b. Survival and growth of *Pinus halepensis* Mill. seedlings in a semiarid environment alter forest soil transfer, terracing and organic amendments. *Ann Sci For* 53: 1099-1122.
- ROLDÁN A., QUEREJETA J.I., ALBALADEJO J., CASTILLO V. 1997. Efecto combinado de la preparación del suelo y la micorrización en el desarrollo de una repoblación con *Pinus halepensis* Mill. en condiciones semiáridas. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona, junio de 1997. Libro de Actas Tomo III. pp. 567-572.
- SMITH S.E., READ D.J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. Cambridge. 605 pp.
- TARKKA M., NEHLS V., HAMPP R., 2005. Physiology of Ectomycorrhiza (ECM). *Progress in Botany* 66: 247-276.
- TORRES P., HONRUBIA M., 1994a. Ectomycorrhizal associations proven for *Pinus halepensis*. *Israel Journal of Plant Sciences* 42: 51-58.
- TORRES P., HONRUBIA M., 1994b. Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. *Ann Sci For* 51: 521-528.
- TORRES P., HONRUBIA M., 1994c. Basidiospore viability in stored slurries. *Mycol Res* 98 (5): 527-530.
- TORRES P., HONRUBIA M., 1994d. A preliminary study on the effect of fire on ectomycorrhizal fungi in Mediterranean areas. En: Azcón-Aguliar C., Barea J.M. (eds).

- Mycorrhizas in integrated systems. From genes to plant development. Published by the European Commission, Brussels, Luxemburg, 1996. pp. 148-151.
- TORRES P., 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., HONRUBIA M., MORTE M.A., 1991. In vitro síntesis of ectomycorrhizae between *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze and *Rhizopogon roseolus* (Corda) TH.M.Fr. with *Pinus halepensis* Miller. Mycotaxon 41 (2): 437-443.
- TORRES P., ROLDÁN A., LANSAC A.R., MARTÍN A., 1995. Ectomycorrhizal formation between *Cistus ladanifer* and *Laccaria laccata*. Nova Hedwigia 60: 311-415.
- TRAPPE J.M., STRAND R.F., 1969. Mycorrhizal deficiency in a Douglas-fir region nursery. Forest Sci, 15: 381-389.
- TRAPPE J.M., 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Ann Rev Phytopathol 15: 203-222.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., SANDERS I.R., 2002. Mycorrhizal Ecology. Ecological Studies 157. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 469 pp.
- WHIPPS J.M., 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. Can J Bot 82: 1198-1227.