



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales
Programa de Doctorado en Ciencias Forestales

**MICORRIZACIÓN CONTROLADA DE PLÁNTULAS DEL
GÉNERO *Pinus* EN VIVERO Y SU INCIDENCIA SOBRE
ATRIBUTOS DEL MATERIAL Y DEL COMPORTAMIENTO**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales

JOSÉ LEONARDO GARCÍA RODRÍGUEZ

Profesor Guía: Manuel Sánchez Olate
Dpto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

CONCEPCIÓN-CHILE
Julio 2018

MICORRIZACIÓN CONTROLADA DE PLÁNTULAS DEL GÉNERO *Pinus* EN VIVERO Y SU INCIDENCIA SOBRE ATRIBUTOS DEL MATERIAL Y DEL COMPORTAMIENTO

Comisión Evaluadora:

Manuel Sánchez Olate (Profesor guía)

Ingeniero Forestal, Dr.

Guillermo Pereira Cancino (Profesor co-guía)

Ingeniero Forestal, Dr.

Jesús Pérez Moreno (Comisión evaluación)

Licenciado en Biología, Ph.

Darcy Ríos Leal (Comisión evaluación)

Prof. de Biología y Química, Dra.

Patricia Sáez Delgado (Comisión evaluación)

Ingeniero Forestal, Dra.

Director de Postgrado:

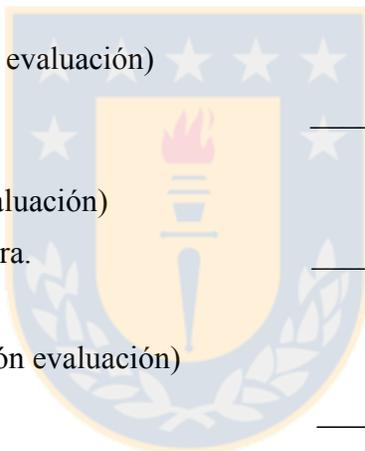
Regis Marcelo Teixeira Mondoça

Ingeniero Químico, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Jorge Cancino Cancino

Ingeniero Forestal, Dr.



DEDICATORIA

Al Señor **Jesús**, con infinita gratitud por todo lo recibido hasta el presente:

“En los ancianos está la sabiduría, y en largura de días el entendimiento”. Job 12:12

A mi **Madre:**

Victorina Rodríguez Flores, Dios te bendiga siempre mujer de manos hábiles, de ingenio ágil y creatividad alegre. Soñadora tú, siempre guerrera invencible tú, y sabía en extremo, aunque nunca lo creíste. Amorosa madre, tú mi mayor fuente de amor, forjadora del hombre que soy, gracias por confiar en mí. Te amaré siempre hasta el último latido de mi corazón y tal vez más allá.

A mi **Padre:**

Raúl García Romero, con gran respeto al hombre trabajador, de talento innato, hiciste de la música tu más grande amor hasta tu último aliento, gracias por nunca rendirte y no dejar de soñar, siempre lamentaré que el tiempo y la vida no nos hayan sido suficientes.

A mis **Hermanos:**

Ma. Del Pilar, Ma. Patricia, Juan, Irma y Raúl a los maravillosos compañeros de este hermoso y turbulento viaje que es la vida, gracias por su amor, su cuidado y el apoyo que me han brindado todos y cada uno de los días de mi vida.

A mis **Padrinos:**

Jorge García Torres y Elia Saenz con enorme respeto y admiración, gracias por siempre estar presentes, por la guía amorosa con desinteresado esmero para que encontrará mi camino. Por ser mi familia, por su amor a prueba de la distancia y el tiempo, y por mis hermanos Jorge Oswaldo y Elia Ernestina.

A mis **Sobrinos:**

A quienes a través de sus detalles y atenciones demuestran que han comprendido que no hay lazo más fuerte que el de la sangre, ni nudo más indisoluble que el amor sincero.

A mis **Amigos:**

A los viejos amigos en México y a los nuevos en Chile a todos, gracias. Dios los bendiga por los maravillosos momentos compartidos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca de financiamiento para la realización del presente proyecto doctoral en el Programa de Doctorado, Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, Chile.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el impulso a la capacitación de su personal científico.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por el apoyo financiero adicional para la realización de este proyecto de investigación en el Programa de Doctorado, Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, Chile.

A la Universidad de Concepción Chile, por la oportunidad que me brindo para la continuación de mi superación académica.

A la Facultad de Ciencias Forestales y el Programa de Doctorado en Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción, Chile, por todas las facilidades brindadas durante mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Manuel Sánchez Olate por la acertada dirección y el apoyo brindado para la realización de este proyecto de tesis.

Al Dr. Guillermo Pereira por su guía sabia y paciente en todas las fases que comprenden la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno por casi 20 años de ser mi guía y maestro, pero sobre todo amigo, por compartirme su pasión por el fascinante mundo de la simbiosis micorrícica.

A la M.C. María Cristina Fernández por su amistad, incondicional apoyo y todas sus enseñanzas, sin duda, útiles para el buen término de este proyecto.

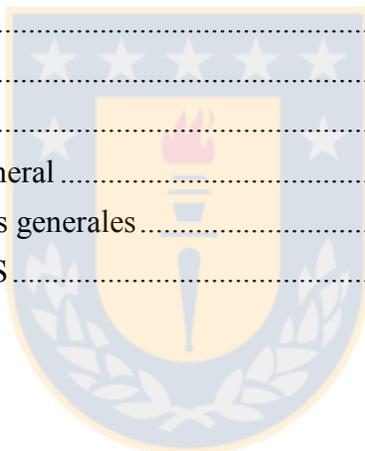
A la M.C. Gabriela Sánchez Viveros, por su valiosa y desinteresada ayuda en la elaboración de este trabajo de investigación, pero sobre todo por su calidad humana y entrañable amistad.

A Don Luis Castro (Don Lucho) con especial agradecimiento al amigo, por su esmerado apoyo en la realización de las diferentes actividades de este proyecto, gracias por la amistad sincera durante todos estos años en Chile.

TABLA DE CONTENIDO

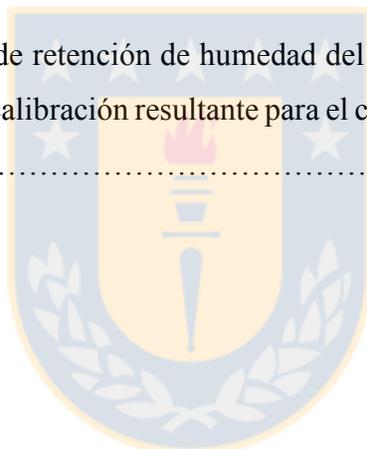
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN GENERAL	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I. Introducción general	1
Hipótesis general	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	20
CAPÍTULO II. Metodología general.....	21
CAPÍTULO III. Caracterización de colonias <i>in vitro</i> y de las ectomicorrizas formadas por <i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Suillus granulatus</i> y <i>Suillus luteus</i> en el sistema radical de <i>Pinus canariensis</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i>	33
Resumen	33
Introducción.....	34
Materiales y métodos.....	37
Resultados y discusión	41
Conclusiones.....	64
Agradecimientos.....	65
Referencias	65
CAPÍTULO IV. Crecimiento <i>in vitro</i> de hongos ectomicorrícicos asociados con plantaciones de <i>Pinus radiata</i> en Chile	74
Summary.....	74
Resumen	75
Introduction	76
Materials and methods.....	77
Results	80
Discussion.....	83
Conclusions	88
Acknowledgments	88
References	89
CAPÍTULO V. Crecimiento e intercambio gaseoso en plántulas del género <i>Pinus</i> inoculadas con hongos ectomicorrícicos en etapa de viverización.....	96
Resumen	96
Introducción.....	97

Materiales y métodos.....	99
Resultados.....	101
Discusión	106
Conclusiones.....	114
Agradecimientos.....	115
Referencias	115
CAPÍTULO VI. Efecto de la disponibilidad hídrica del suelo de cultivo en la respuesta de parámetros morfofisiológicos en plantas de <i>Pinus</i> spp. micorrizadas y no micorrizadas ..	122
Resumen	122
Introducción.....	123
Materiales y métodos.....	125
Resultados.....	131
Discusión	144
Conclusiones.....	154
Agradecimientos.....	157
Referencias	157
CAPÍTULO VII. Discusión general	166
CAPÍTULO VIII. Conclusiones generales.....	177
REFERENCIAS GENERALES.....	180



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Atributos funcionales y tests empleados en el control de calidad de plantas forestales y estudios científicos. En cursiva los atributos más utilizados y en cursiva negrita los atributos utilizados en este estudio.	10
Tabla 3.1 Combinaciones hongo-planta utilizadas para la caracterización de ectomicorrizas...39	
Tabla 6.1 Condiciones promedio de cultivo de las plantas de pino al interior del invernadero en tres horarios del día y el comparativo de PAR al exterior del invernadero.....	127
Tabla 6.2 Valores de la curva de retención de humedad del suelo arenoso, su correspondencia en Mpa y valores de calibración resultante para el contenido de humedad con el equipo TDR.....	128



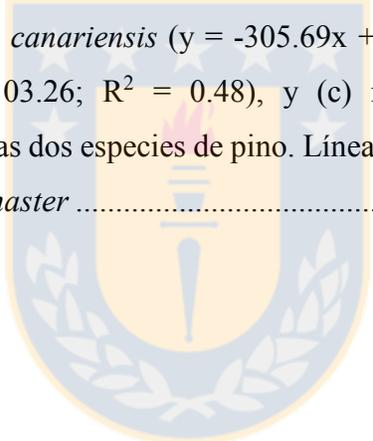
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Características estructurales de raíces de angiospermas y gimnospermas con micorriza arbuscular (MA) y ectomicorriza (ECM). 1) Epidermis; 2) Cortex; 3) Endodermis; 4) Xilema; 5) Floema; 6) Red de Hartig; 7) Manto fúngico; 8) Micelio externo y 9) Arbúsculos. (Modificado de Bücking et al. (2012), InTech).	4
Figura 2.1 Desarrollo progresivo del proyecto, ensayos y actividades realizadas, variables analizadas y ambiente de cultivo. Las flechas indican conexión de actividades entre las etapas; (*) los resultados se reportan con los resultados de una etapa anterior.....	21
Figura 2.2 Placas Petri de 50 mm de diámetro con PDA como medio de cultivo. (1) Aislamiento utilizando carpóforos de <i>Suillus</i> sp. (a y b trozos por placa) ejemplificando el proceso para obtención de las cepas de los hongos ectomicorrízicos <i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Suillus granulatus</i> y <i>S. luteus</i> (c a f).....	22
Figura 2.3 Producción de inoculantes a partir de los carpóforos recolectados en plantaciones adultas de <i>Pinus radiata</i> . (a); licuado en agua destilada estéril (c), suspensiones esporales madre (de alta concentración) (b); envasado y conservación en refrigeración (b y c).	23
Figura 2.4 Diagrama del reverso de una placa Petri que ilustra el método utilizado para la medición de la variable crecimiento radial promedio de las cepas de los hongos ectomicorrízicos <i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Suillus granulatus</i> y <i>S. luteus</i> cultivadas <i>in vitro</i>	24
Figura 2.5 Calibración del equipo TDR con el contenido de humedad real y gravimétrico asociados a la curva de retención de humedad del suelo utilizada para establecer los niveles de disponibilidad hídrica del suelo.....	29
Figura 2.6 Plantas de <i>Pinus</i> sp. trasplantadas a bolsas de polietileno negro de 1500 mL de capacidad.....	30
Figura 3.1 Haz y envés de placas Petri con cepas representativas con crecimiento micelial típico de <i>Rhizopogon luteolus</i>	42
Figura 3.2 Estructuras del micelio de <i>Rhizopogon luteolus</i>	43

Figura 3.3 Haz y envés de placas Petri con cepas representativas con crecimiento miceliar de <i>Suillus granulatus</i>	44
Figura 3.4 Estructuras del micelio de <i>Suillus granulatus</i>	45
Figura 3.5 Haz y envés de placas Petri con cepas representativas con crecimiento miceliar de <i>Suillus luteus</i>	47
Figura 3.6 Estructuras del micelio de <i>Suillus luteus</i>	48
Figura 3.7 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>R. luteolus</i> + <i>P. canariensis</i>	50
Figura 3.8 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>R. luteolus</i> + <i>P. pinea</i>	52
Figura 3.9 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>R. luteolus</i> + <i>P. pinaster</i>	53
Figura 3.10 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>R. luteolus</i> + <i>P. radiata</i>	55
Figura 3.11 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>S. luteus</i> + <i>P. canariensis</i>	56
Figura 3.12 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>S. luteus</i> + <i>P. pinea</i>	58
Figura 3.13 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>S. luteus</i> + <i>P. pinaster</i>	60
Figura 3.14 Caracterización de estructuras micorrícicas de <i>S. luteus</i> + <i>P. radiata</i>	61
Figura 3.15 Grosor de manto fúngico (a) y diámetro de hifas (b) de las micorrizas resultantes de la combinación de los HECM <i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Suillus granulatus</i> y <i>S. luteus</i> con las raíces de plantas de <i>Pinus canariensis</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. pinaster</i> y <i>P. radiata</i>	63
Figura 4.1 Sporomes of the ectomycorrhizal fungi <i>Rhizopogon luteolus</i> (A), <i>Suillus granulatus</i> (B), <i>S. luteus</i> (C); and <i>in vitro</i> mycelial growth at three temperatures (D, E and F) and five pH values (G, H and I) in Modified Melin Norkrans culture medium.....	79
Figura 4.2 (A) Radial growth (mm day ⁻¹) and (B) mycelial biomass (mg) of three fungal ectomycorrhizal species at three culture temperatures.	81
Figura 4.3 (A) Radial growth (mm day ⁻¹) and (B) mycelial biomass (mg) of three fungal ectomycorrhizal species at five pH.....	82
Figura 4.4 Average (A and C) accumulated and (B and D) non-accumulated radial growth of three fungal ectomycorrhizal species at three temperatures	84
Figura 5.1 Producción de biomasa (peso seco) de plantas de cuatro especies de pino inoculadas los hongos ectomicorrícicos (HECM)	102

Figura 5.2 (a) Crecimiento de planta control e inoculada de <i>P. pinea</i> . (b) <i>P. canariensis</i> . (c) <i>P. pinaster</i> . (d) detalles de cepellón micorrizado. (e) sistema radicular de <i>P. pinaster</i> altamente micorrizado. (f) características de estructura micorrícicas de <i>R. luteolus</i> . (g). <i>S. luteus</i> . (h) corte transversal de raíz micorrizada. (i) característica de la red de Hartig intercelular.	104
Figura 5.3 Parámetros de intercambio gaseoso (a, b) y morfológicos de crecimiento (c) de plantas de cuatro especies de pino inoculadas los hongos ectomicorrízicos <i>R. luteolus</i> , <i>S. luteus</i> por separado y en combinación a dos concentraciones esporales.....	105
Figura 6.1 Parámetros morfológicos (a, b y c) y fisiológicos (d) de crecimiento en plantas de <i>P. canariensis</i> no inoculadas (H0) e inoculadas con suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2).....	131
Figura 6.2. Plantas de <i>Pinus canariensis</i> inoculadas y no inoculadas con esporas de los hongos ectomicorrícicos <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2)	132
Figura 6.3 Parámetros morfológicos (a y b) y fisiológicos (c) de crecimiento en plantas de <i>P. canariensis</i> no micorrizadas y micorrizadas en respuesta a tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2).)	133
Figura 6.4 Porcentaje de micorrización (a) y potencial hídrico prealba (b) en plantas de <i>P. canariensis</i> no micorrizadas (H0) y micorrizadas con esporas de los HECM <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2) y su interacción con tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2).....	134
Figura 6.5 Parámetros morfológicos de crecimiento (a, b y c) en plantas de <i>P. pinaster</i> no inoculadas (H0) e inoculadas con esporas de los HECM <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2).....	135
Figura 6.6 Plantas de <i>Pinus pinaster</i> inoculadas y no inoculadas con esporas de los hongos ectomicorrícicos <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2)	136
Figura 6.7 Potencial hídrico prealba (ψ_{pd}) y tasa de fotosíntesis (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (a, b y c); conductancia estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (d, e y f); eficiencia del uso de agua (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) (g, h, i) y masa foliar por unidad de área (LMA , g cm^{-2}) (j, k y l) en plantas de <i>P. canariensis</i> y <i>P. pinaster</i>	138

Figura 6.8 Peso seco aéreo (a) y potencial hídrico prealba (b) en plantas de <i>P. pinaster</i> no micorrizadas (H0) y micorrizadas con esporas de los HECM <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2).....	140
Figura 6.9 Porcentaje de micorrización (a) y tasa de fotosíntesis (b) en plantas de <i>P. pinaster</i> no micorrizadas (H0) y micorrizadas con esporas de los HECM <i>R. luteolus</i> (H1) y <i>S. luteus</i> (H2) y su interacción con tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2).....	141
Figura 6.10 Curva de asimilación de CO ₂ m ⁻² s ⁻¹ de plantas de <i>Pinus canariensis</i> (a) y <i>P. pinaster</i> (b) de 24 meses de edad a diferentes valores de PAR	142
Figura 6.11 Eficiencia del uso de agua (<i>WUE</i> , μmol CO ₂ mol ⁻¹ H ₂ O) vs. (a) tasa de fotosíntesis (<i>A_N</i> ; μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) para <i>P. canariensis</i> (y = -4.1741x + 135.96; R ² = 0.31) y <i>P. pinaster</i> (y = -883x + 91.945; R ² = 0.07), (b) conductancia estomática (<i>g_s</i> ; mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) para <i>P. canariensis</i> (y = -305.69x + 128.05; R ² = 0.62) y <i>P. pinaster</i> (y = -120.89x + 103.26; R ² = 0.48), y (c) masa foliar por unidad de área (<i>LMA</i> ; g cm ⁻²) para las dos especies de pino. Líneas de puntos <i>P. canariensis</i> y líneas continuas para <i>P. pinaster</i>	143



RESUMEN GENERAL

En este trabajo se evaluó el efecto de la micorrización controlada de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* sobre los atributos del material y del comportamiento de *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* al cultivarse en condiciones controladas y vivero. Como principales resultados se tienen los siguientes: En cultivo *in vitro*, la temperatura tuvo en *Rhizopogon luteolus* un efecto significativamente mayor sobre el crecimiento radial (RG) y la biomasa micelial (MB) que en el micelio de *S. granulatus* y *S. Luteus*, pero presentó la sensibilidad mayor a los cambios de pH. Los HECM en raíces de *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* presentaron diferentes características macro (color, textura, margen de la colonia) y microscópicas (dimensiones de la estructura micelial). La combinación, *R. luteolus* + *P. pinea* presentó ectomicorrizas de tipo coraloide, pocos rizomorfos y manto grueso ($73.97 \pm 3.24 \mu\text{m}$), mientras que las demás combinaciones de HECM + *Pinus* tuvieron ramificaciones dicotómicas simples, abundantes rizomorfos y manto fúngico delgado (*P. pinaster* + *R. luteolus*; $16.41 \pm 0.79 \mu\text{m}$ y *S. luteus*; $29.38 \pm 1.08 \mu\text{m}$). En condiciones controladas, suspensiones esporales (1×10^7 y 1×10^8) de *R. Luteolus* y *S. luteus* inoculadas en cuatro especies de pino, produjeron (12 y 24 meses) porcentajes de micorrización (PM) mayores al 60 y 80%, respectivamente, excepto en *P. radiata* inoculado con *S. luteus*. Todas las especies de pino presentaron diferencias significativas entre tratamientos, en al menos una de las variables (altura (ALT), diámetro al cuello (DAC), índice de Dickson (ICD), conductancia estomática (g_s)). *P. canariensis* presentó mayor DAC, PM y ICD. Mientras que, *P. pinea* mostró la mayor ALT y g_s , seguida por *P. pinaster* que tuvo el PM y A_N mayor. En todas las variables evaluadas, *P. radiata* presentó los valores menores. En condiciones controladas y de vivero, la inoculación por suspensión esporal (1×10^7) de dos HECM produjo efectos significativos y diferenciados en algunos parámetros morfofisiológicos, dependiendo de las combinaciones entre especies de micobiontes, fitobiontes y niveles de disponibilidad hídrica del suelo. El potencial hídrico prealba (Ψ_{pd}) disminuyó de acuerdo a la disponibilidad hídrica del suelo impuesta provocando el ajuste osmótico en las plantas. *P. canariensis* micorrizada con *R. luteolus* y disponibilidad hídrica baja tiende a incrementar el PM. Mientras que, ante una disponibilidad hídrica media la micorrización con *S. luteus* le indujo mayor ALT, PSA, índice de robustez (IR) y masa foliar por área (LMA). Al incrementar el déficit hídrico (T0, T1 y T2)

se registró mayores promedios en PSA, peso seco de nuevas raíces (PSRN) y eficiencia del uso del agua (*EUA*), respectivamente. *P. pinaster* expuesta a un déficit hídrico medio presentó mayor PM, con ambas especies de HECM y las mayores tasas de A_N en plantas inoculadas con *R. luteolus* y *S. luteus*, en déficit hídrico bajo. La micorrización de *S. luteus* sin déficit hídrico favoreció un mayor PSA, ALT y DAC. Estos resultados aportan evidencia de que *S. luteus* bajo condiciones de déficit hídrico parece influir positivamente más que *R. luteolus* en el comportamiento de algunas variables morfofisiológicas en dos especies de pino. La micorrización controlada con *R. luteolus* y *S. luteus* tiene un efecto positivo dependiendo de las combinaciones de micobiontes y fitobiontes propuestas.



ABSTRACT

It was evaluated the effect of the controlled mycorrhization of the ectomycorrhizal fungi (HECM) *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* and *S. luteus* on the attributes of the material and the behavior of *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* and *P. Radiates* when grown under controlled conditions and nursery. The following are the main results: *In vitro* culture, the temperature in *Rhizopogon luteolus* had a significantly effect on radial growth rate (RG) and mycelial biomass increase (MB) than in the mycelium of *S. granulatus* and *S. Luteus*, but presented the highest sensitivity to changes in pH. The HECM in roots of *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* and *P. radiata* presented different macro (color, texture, margin of the colony) and microscopic features (dimensions of the miceliar structure). The combination, *R. luteolus* + *P. pinea* showed coraloid ectomycorrhizae, few rhizomorphs and thick mantle ($73.97 \pm 3.24 \mu\text{m}$), while the other combinations of HECM + *Pinus* had simple dichotomous ramifications, abundant rhizomorphs and thin fungal mantle (*P. pinaster* + *R. luteolus*; $16.41 \pm 0.79 \mu\text{m}$ and *S. luteus*; $29.38 \pm 1.08 \mu\text{m}$). Under controlled conditions, spore suspensions (1×10^7 and 1×10^8) of *R. luteolus* and *S. luteus* inoculated in four pine species, produced (12 and 24 months) mycorrhization percentages (PM) greater than 60 and 80%, respectively, except in *P. radiata* seedlings inoculated with *S. luteus*. All pine species showed significant differences between treatments, in at least one of the variables (height (ALT), diameter to the root collar (DAC), Dickson quality index (ICD), stomatal conductance (g_s), *P. canariensis* presented higher DAC, PM and ICD, while *P. pinea* showed the highest ALT and g_s , followed by *P. pinaster* that had the highest PM and A_N . In all the variables evaluated, *P. radiata* showed the lowest values. In the nursery, the inoculation by spore suspensions (1×10^7) of two HECM produced significant and differentiated effects in some morphophysiological parameters, depending on the combinations between species of mycobionts, phytobionts and levels of water availability of the soil. The prealba water potential (Ψ_{pd}) decreased from according to the water availability of the soil imposed, causing the osmotic adjustment in the plants. *P. canariensis* seedlings mycorrhized with *R. luteolus* and low water availability tends to increase PM. While, in the presence of medium water availability, mycorrhization with *S. luteus* induced higher ALT, PSA, robustness index (IR) and leaf mass per area (LMA). When the hydric deficit increased (T0, T1 and T2), higher averages were registered in PSA, dry weight of new roots (PSRN) and efficiency

of water use (*EUA*), respectively. *P. pinaster* exposed to a medium water deficit showed higher PM, with both HECM species and higher A_N rates in plants inoculated with *R. luteolus* and *S. luteus*, in low hydrologic deficit. The mycorrhization of *S. luteus* without hydric deficit favored a higher PSA, ALT and DAC. These results provide evidence that *S. luteus* under conditions of water deficit seems to positively influence more than *R. luteolus* in the behavior of some morphophysiological variables in two pine species. The controlled mycorrhization with *R. luteolus* and *S. luteus* has a positive effect depending on the combinations of mycobionts and phytobionts proposed.



CAPÍTULO I

Introducción general

Las raíces junto con los tallos y hojas, constituyen los principales órganos de las plantas vasculares. Desde las primeras etapas del ciclo de vida de las plantas, incluyendo la germinación, las principales funciones de las raíces son anclar y sostener la planta, para buscar, absorber, transportar el agua, los iones de la tierra, y para transportar y almacenar los productos de la fotosíntesis a partir del sistema de brotes (Dubrovsky y North 2002, Kerk y Sussex 2012). Para especies que se desarrollan en ambientes con recursos limitados, y variables como el suelo, agua, zonas rocosas o arenosas estas funciones de la raíz cobran especial relevancia (Dubrovsky y North 2002). Por tanto, la supervivencia de las plantas terrestres depende de la capacidad de las raíces para obtener agua y nutrientes del suelo. El crecimiento direccional de las raíces con relación a la disponibilidad de agua se conoce como hidrotropismo, y comienza en la cofia con la percepción del gradiente de humedad (Cassab y Sánchez-Guevara 2011).

Para las primeras plantas que evolucionaron en la tierra durante el periodo Devónico (hace 416-360 millones de años (Ma)) esta fue una época que implicó grandes cambios para ellas, uno de los más importantes fue el desarrollo temprano de raíces. Desde el inicio, la asociación simbiótica fue de gran importancia en la evolución de una vegetación herbácea diminuta desarraigada y sin hojas (Heckman *et al.* 2001, Valencia *et al.* 2004). Específicamente en el periodo Ordovícico (500-440 Ma), y finales del Cámbrico (544-500 Ma), periodo en el que se inicia el “asalto” a los ambientes terrestres (Honrubia 2009). En la denominada “terrestrialización” referida a la colonización de ambientes terrestres por parte de las plantas (Selosse y Le Tacon 1998). La Tierra era muy diferente a lo actual en términos de paleogeografía de los continentes, paleoclima y biodiversidad. En ese largo periodo, existió intensa actividad volcánica, derivas continentales; severas glaciaciones, prolongados periodos de profunda sequía, globales y locales. Tan exigentes condiciones ambientales soportan la hipótesis sobre la importancia de la simbiosis endomicorrícica como mecanismo de colonización de aquellos paleoambientes progresivamente emergidos (Honrubia 2009).

La evidencia científica respaldada por estudios paleobotánicos, morfoanatómicos y filogenéticos con técnicas moleculares ha demostrado la coevolución entre hongos micorrícicos y las raíces de las plantas (Honrubia 2009). Los registros más antiguos de esporas e hifas fósiles, Ordovícico de Wisconsin, se estiman en unos 460 Ma (Redecker *et al.* 2000), con extraordinaria semejanza a las de los actuales *Glomales*, *Glomeromycota* (Schüßler *et al.* 2001), son la evidencia de la antigüedad de los hongos formadores de las micorrizas arbusculares (MA) (Redecker 2002). Los primeros fósiles bien conservados de ectomicorrizas (pino x *Rhizopogon* o *Suillus*) son estimados en 50 Ma, en el Eoceno Medio (LePage *et al.* 1997). El desarrollo de las ectomicorrizas ocurrió en el Cretácico hace al menos 130 Ma, y su aparición respondió a la necesidad de adaptación de grupos vegetales arbóreos con gran desarrollo aéreo a ambientes inhóspitos, las mayores exigencia nutricionales requirieron sistemas radicales jerárquicamente bien ramificados (Honrubia 2009).

El término micorriza, que literalmente significa “hongo-raíz”, fue propuesto por Patólogo Alemán Albert Bernhard Frank (Frank 1885) en su estudio de las relaciones microbio-planta del suelo, introdujo el término 'micorriza', para definir asociaciones simbióticas (“vivir conjuntamente dos o más organismos diferentes”), mutualistas, no patógenas, entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados (Siddiqui y Pichtel 2008, Honrubia 2009) y que implica un intercambio bidireccional de nutrientes (Smith y Read 2008). Dentro de las diversas simbiosis existentes, las micorrizas son consideradas asociaciones mutualistas altamente evolucionadas entre hongos del suelo y las raíces de las plantas. Los hongos involucrados son principalmente Basidiomycetes, Ascomycetes, Glomeromycetes y el 95% de las plantas terrestres (Brundrett 2009). El término micorriza describe una alta relación de interdependencia mutualista, donde la planta hospedante recibe nutrientes minerales y el hongo obtiene compuestos de carbono producto de la fotosíntesis (Harley y Smith 1983, Brundrett *et al.* 1996b). Actualmente existen conceptos más sencillos como el propuesto por (Andrade-Torres 2010) quien considera a la micorriza como un proceso dinámico, mediante el cual se conforma una estructura que permite el mutuo intercambio de agua y nutrimentos mediante la interacción de ciertas partes especializadas de al menos dos individuos (planta y hongo). Por su parte Brundrett (2004) menciona que una micorrizas es: una asociación simbiótica esencial para uno o ambos socios, entre un hongo (especializado para la vida en

suelos y plantas) y una raíz (u otro órgano en contacto con el sustrato) de una planta viva, que es el principal responsable de la transferencia de nutrientes. Las micorrizas ocurren en un órgano de planta especializado donde el contacto íntimo resulta del desarrollo sincronizado de hongos y plantas. Esta es una definición nueva y más amplia que incluye a todos los tipos de micorrizas y excluye otras asociaciones de hongos y plantas.

Brundrett (2004) y Finlay (2008) reconocen siete tipos de micorrizas (del griego *mýkes* - hongo y *rhiza* - raíz; los hongos - raíces) micorriza arbuscular (MA), ectomicorriza (ECM), micorriza orquidíode, ericoide, ectoendomicorriza y las micorrizas arbutoide y monotropoide (involucra hongos Basidiomycetes) estas últimas según Smith y Read (2008) deben ser tratadas por separado por contar con características distintivas bien definidas. Las MA y las ECM son los tipos de micorrizas más abundantes y generalizadas (Allen *et al.* 2003, Smith y Read 2008). Los hongos micorrícicos arbusculares (MA) son mutualistas obligados pertenecientes al *phylum* Glomeromycota ampliamente distribuidos en los ecosistemas globales (Redecker *et al.* 2000). La micorriza arbuscular (MA) es la asociación micorrícica más común establecida con más del 80% de todas las plantas vasculares (Brundrett 2002). Aunque también están ampliamente distribuidos los hongos ectomicorrícicos (HECM) (*phyla* Ascomycota y Basidiomycota) solo están asociados con el 3% de las familias de plantas vasculares (Smith y Read 2008), 5% (Trappe 1977) y 2% de acuerdo con Brundrett (2009) y Tedersoo *et al.* (2010).

Las ectomicorrizas (ecto-“por fuera”), se caracteriza en que los hongos involucrados (micobiontes) colonizan los espacios entre las células corticales de la raíz de sus hospederos (fitobiontes), sin penetrar la pared celular (Figura 1.1). Este tipo de micorriza se establece entre 5,000 a 7,000 especies de hongos ectomicorrícicos (HECM) y \pm 3000 especies de plantas que habitan en zonas boscosas de clima templado-frío y algunas regiones tropicales (Pérez-Moreno 2007). La ECM es el tipo de micorriza más importante en especies forestales (Brundrett *et al.* 1996a), y por ello, la más relevante en la producción de plantas en viveros forestales. Esta simbiosis, es ampliamente utilizada en el establecimiento de plantaciones forestales debido a que aumenta la resistencia de las plantas al estrés post trasplante, especialmente en sitios con un alto grado de perturbación; como también en localidades donde se realiza la introducción de especies (Brundrett *et al.* 1994, Guerrero Forero 1996, Smith y Read 2008). Las

ectomicorrizas (ECM) son cortas en longitud y en su mayoría ramificadas, en ellas las hifas del hongo penetran únicamente el espacio intercelular de la región del cortex hasta la banda de Caspari, pero no en el interior de las células, forman una red intercelular en el apoplasto denominada red de Hartig (Brundrett *et al.* 1994, Gárate y Bonilla 2000, Tagu *et al.* 2002). De acuerdo con Smith y Read (2010) y Brundrett *et al.* (1996b) las estructuras características de las ectomicorrizas son: Hifas o micelio, el manto fúngico, hifas extraradicales, fíbulas y red de Hartig (Figura 1.1).

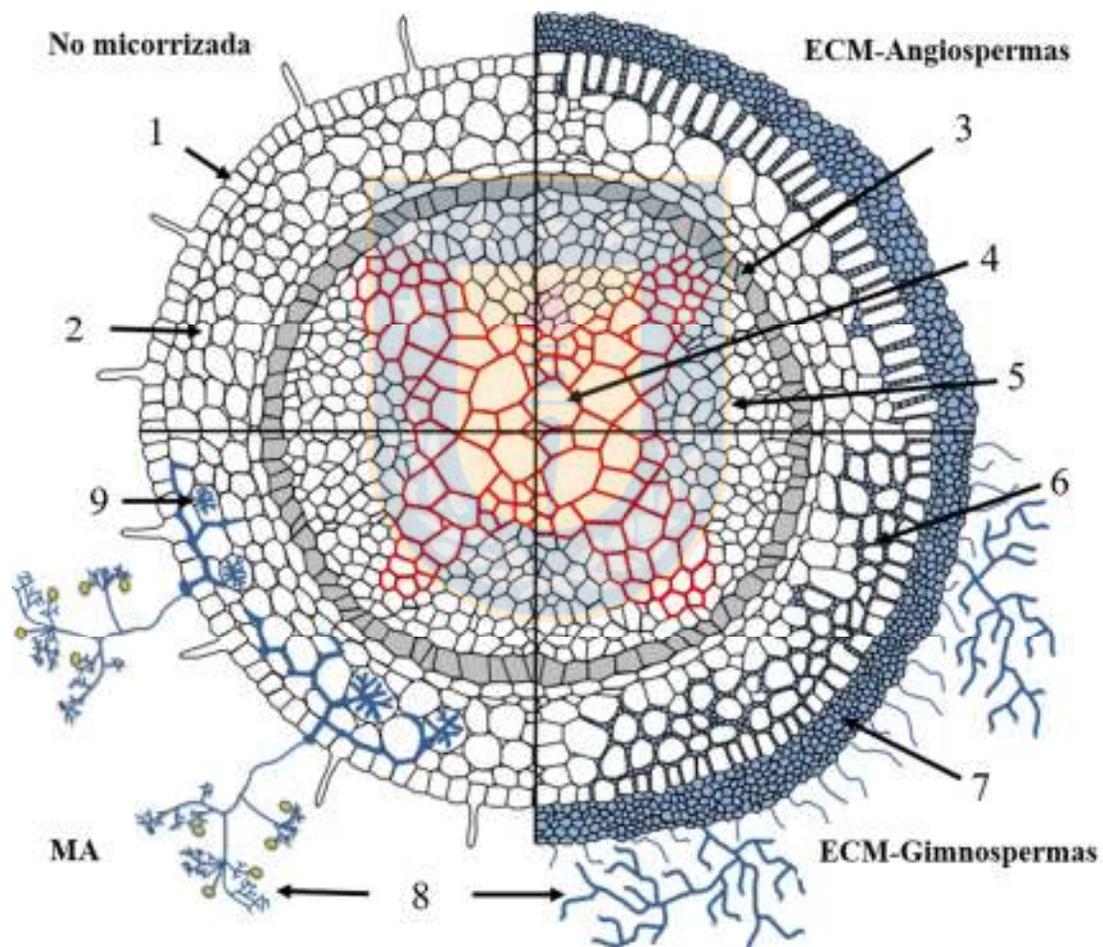


Figura 1.1 Características estructurales de raíces de angiospermas y gimnospermas con micorriza arbuscular (MA) y ectomicorriza (ECM). 1) Epidermis; 2) Cortex; 3) Endodermis; 4) Xilema; 5) Floema; 6) Red de Hartig; 7) Manto fúngico; 8) Micelio externo y 9) Arbúsculos. (Modificado de Bücking *et al.* (2012), InTech).

En los bosques, a diferencia de las plantas, los hongos no elaboran sus alimentos razón por la cual los toman ya elaborados por otros organismos actuando como saprobios (degradadores) o mutualistas (simbióticos) (Pérez-Moreno et al., 2011). Las micorrizas son un componente de calidad ecofisiológica para el mantenimiento de los bosques naturales (Martínez-Reyes *et al.* 2012). Particularmente la ectomicorriza posee enorme importancia ecológica porque mejora la capacidad de las plantas para la absorción de agua y nutrientes minerales del suelo (fósforo y nitrógeno), aumenta la resistencia a estrés de tipo abiótico como la sequía, reduce la toxicidad causada por metales pesados, salinidad y otros contaminantes, e incrementa la resistencia de las plantas a ciertos patógenos de la raíz (Wright *et al.* 1998, Carrera-Nieva y López-Ríos 2004). Asimismo porque la mayoría de los hospederos son especies arbóreas dominantes en bosques templados, en regiones alpinas y boreales, en bosques mediterráneos, en amplias áreas tropicales y subtropicales (Garibay-Orijel *et al.* 2013). Aunque también puede encontrarse asociada a especies arbustivas y a pocas plantas herbáceas (Brundrett *et al.* 1996b, Wilcox 1996, Vogt *et al.* 1997). En los ecosistemas forestales de zonas templadas, boreales y algunas tropicales, la simbiosis ECM se establece entre angiospermas y gimnospermas leñosas y hongos principalmente Basidiomycetes y Ascomycetes y es característica de grupos importantes de árboles y arbustos de las familias Pinaceae, Cupressaceae, Fagaceae, Betulaceae y Salicaceae (Pérez-Moreno y Read 2004). No obstante que del 10 al 15% de la producción total de fotosintatos es transferido a los micobiontes, la presencia de esta simbiosis es obligada para los ecosistemas forestales (Marks y Kozlowski 1973, Villarreal y Perez-Moreno 1989, Pérez-Moreno 1995).

La relación entre hongos ectomicorrícicos y árboles forestales es de particular interés cuando se busca incrementar la productividad de diferentes especies forestales en plantaciones, ya que de la productividad dependen la conservación de los ecosistemas y la disminución de los turnos de cosecha, aumentando los beneficios económicos, ecológicos y sociales (Wilcox 1996). En todo el mundo, el incremento en el establecimiento de plantaciones forestales comerciales con especies de rápido crecimiento, se debe a la pérdida de la productividad, al deterioro de los recursos naturales, a la baja productividad de los bosques naturales y a la creciente demanda de productos y materias primas de origen forestal (Cetina-Alcalá 1997, Cano-Pineda 1998). Así el principal objetivo de la producción en viveros forestales es el abastecimiento de plantas de alta

calidad y en cantidades suficientes que aseguren el establecimiento exitoso de plantaciones forestales (Birchler *et al.* 1998, Barajas Rodríguez *et al.* 2004). Una planta de calidad es aquella cuyos atributos le permiten acorde a los factores edafoclimáticos de los sitios, después de ser plantada, continuar con un desarrollo apropiado. Los atributos de calidad de planta son de tipo morfológico y fisiológico (Peñuelas y Ocaña 2000). La calidad está determinada por el origen del material vegetal propagado y por el conjunto de prácticas de cultivo aplicadas en vivero. En general, los criterios para determinar la calidad de la planta se basan en evaluar estado y tamaño de la parte aérea de la planta. Dentro de las variables o parámetros morfológicos para evaluar la calidad de planta, actualmente está incluida la presencia de micorrizas en el sistema radical de las plantas producidas en vivero y esto es porque el sistema radical es el órgano de absorción de agua y nutrientes (Pera y Parladé 2005). El éxito en el establecimiento de plantaciones forestales, en muchos casos, ha estado determinado por la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas producidas en vivero, en particular en sitios con determinados tipos de suelos y condiciones ambientales, al introducir especies exóticas de rápido crecimiento en zonas forestales productivas y en la reforestación de zonas agrícolas abandonadas (Pera y Parladé 2005, Valdés *et al.* 2010, De La Parra *et al.* 2013).

Existen básicamente dos tipos de sistemas para la producción de planta en viveros forestales: 1) producción a raíz desnuda, donde las plantas se desarrollan a campo abierto en camas de crecimiento y 2) producción en contenedores, donde las plantas se desarrollan en sustratos de crecimiento artificiales. En ambos casos las plantas pueden reproducirse sexualmente (por semillas) o multiplicarse vegetativamente (por medio de estacas) (Landis *et al.* 1990, Birchler *et al.* 1998, Prieto Ruíz *et al.* 2004). En el sistema de producción a raíz cubierta las plantas son cultivadas en contenedores rígidos, diseñados especialmente para este propósito ya sea al aire libre o en invernaderos (Tinus y McDonald 1979, Prieto *et al.* 2009). Las mezclas de sustrato son artificiales (libres de propágulos de malezas, plagas y/o enfermedades), estos deben proporcionar buen anclaje, correcta aireación y drenaje, retener el agua necesaria para el crecimiento de la planta y poner a disposición los elementos nutritivos adicionados en solución, evitando en lo posible, su lixiviación (Tinus y McDonald 1979, Pastor-Sáez 1999). Por tanto la fertilización es una práctica importante, esta contribuye al crecimiento de la planta, altera la composición nutritiva de los tejidos, la capacidad de arraigo, la resistencia a estrés

hídrico o al frío y a las enfermedades (Oliet *et al.* 2000). Los nutrimentos se adicionan mediante la fertilización ya sea en el sustrato o en el agua de riego, o en ambas formas (Prieto Ruíz *et al.* 2012). Los requerimientos nutrimentales varían conforme las plantas crecen, el nivel de nutrimentos, esencialmente N, P y K se ajusta a las diferentes fases de crecimiento (establecimiento, crecimiento rápido y endurecimiento o preacondicionamiento) (Landis y Nisley 1990). Sin embargo la fertilización es costosa y poco amigable con el medio ambiente (Carvajal y Mera 2010), por tanto, la inoculación de hongos micorrícicos a las raíces de las plantas en vivero adquiere más relevancia (Prieto *et al.* 2009). El momento más simple y generalmente más apropiado para inocular con HECM es durante la producción de la planta en el vivero (Bassani *et al.* 2013, Garza-Ocañas 2014). Los beneficios de la inoculación suelen ser evidentes hasta que las plantas son establecidas en campo, donde a través de su micelio externo, los HECM transportan agua y nutrientes minerales como N, P, K. Incluso formas orgánicas de N y P, poco accesibles, son movilizadas del suelo o de sustratos orgánicos naturales a los fitobiontes (Read y Perez-Moreno 2003).

Por utilizar sustratos artificiales en la viverización de plantas que no contienen fuentes de inóculo de HECM, en la mayoría de los viveros es necesaria la introducción de HECM (Pera y Parladé 2005). Las fuentes de inóculo de HECM más utilizadas en vivero son las esporas y los cultivos miceliales producidos en laboratorio (Bassani *et al.* 2013). La aplicación de soluciones esporales es la forma más práctica y económica para este fin (Johnson y Pflieger 1992, Fini *et al.* 2011). Los HECM producen efectos diferentes sobre un mismo hospedero o fitobionte (Newsham *et al.* 1995). Los efectos varían dependiendo de la combinación de especies planta-hongo (Klironomos 2003, Powell y Klironomos 2007). La selección de HECM se basa en diferencias fisiológicas y ecológicas entre especies y entre cepas (Marx *et al.* 1992, Valdés *et al.* 2010). En contraste con los hongos AM, muchos hongos ECM se pueden cultivar en un cultivo axénico sin un huésped, y esto permite estudiar su capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono o nutrientes (Salzer y Hager 1991) y probar su cultivo *in vitro* bajo diferentes condiciones ambientales y del medio de cultivo. La selección de especies de HECM para su manipulación en laboratorio y vivero es clave para el éxito de las plantaciones (Marx *et al.* 1991, Honrubia *et al.* 1992, Santelices *et al.* 2012). Lo anterior debido a que el crecimiento de los HECM en la naturaleza es afectado principalmente por factores como la

temperatura y pH entre otros (Harley y Smith 1983, Frioni 1999a, Lazarević *et al.* 2016). Estos dos factores afectan también en el establecimiento y crecimiento de estos hongos al ser cultivados *in vitro* (Sánchez *et al.* 2001, Pereira *et al.* 2007, García-Rodríguez *et al.* 2017).

Los HECM en general son mesófilos y la temperatura afecta directamente su crecimiento, a mayor temperatura más enzimas y mayor velocidad de reacción, hasta cierto límite, porque a temperaturas elevadas ocurre la desnaturalización de proteínas y otras macromoléculas de la membrana celular (Frioni 1999a). El pH del suelo también influencia factores que afectan la actividad microbiana, tal como la solubilidad y la ionización de los constituyentes de la solución inorgánica y orgánica del suelo, y éstos a su vez afectan la actividad enzimática del suelo (Voroney 2006). Los hongos, incluidos los HECM, poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes a nivel de membrana. Por ello los hongos, no obstante ser neutrófilos (5 a 12 pH, 7 como óptimo), los favorecen ambientes ácidos (Frioni 1999a, Pereira *et al.* 2007, Webster y Weber 2007). Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) como los HECM poseen alta variabilidad genética por lo que su selección debe ser constante a través de ensayos de laboratorio, invernadero y campo (Frioni 1999b). Los cultivos puros *in vitro* contribuyen al estudio del desarrollo de diferentes cepas de hongos y son un método básico para conocer su comportamiento ante diferentes condiciones de cultivo (Pirt 1975, Pereira *et al.* 2007). El crecimiento en diámetro de las colonias, la velocidad de crecimiento radial y la producción de biomasa son parámetros empleados ampliamente en bioensayos (Eng *et al.* 2003). Es deseable conocer más sobre las especies de HECM asociadas a plantaciones para maximizar la combinación planta-hongo-sitio utilizando plantas micorrizadas con especies de HECM adaptadas a las condiciones de los sitios de plantación (Pereira *et al.* 2007). La identificación de nuevas cepas de HECM es a través de estudios orientados a la síntesis micorrícica con este tipo de hongos (Díaz *et al.* 2009). Al igual que para otro tipo de hongos, la valoración de los rasgos genéticos y la diversidad fenotípica es fundamental para distinguir cepas con genotipos de alta productividad (Andrino *et al.* 2011).

Pero particularmente los hongos micorrícicos poseen enorme importancia ecológica debido a que mejoran la capacidad de la planta para la absorción de nutrimentos minerales y agua del suelo (Pérez-Moreno y Read 2004). Lo anterior indica que la simbiosis micorrícica puede tener

un efecto positivo sobre las variables de crecimiento. Estudiar el efecto benéfico de la simbiosis micorrícica puede ser posible a través del comportamiento de diferentes variables morfológicas y fisiológicas, de forma conjunta, para determinar los efectos de determinadas especies, cepas y/o procedencias de HECM sobre dichas variables de crecimiento (Rincón *et al.* 2005). Previamente seleccionadas mediante cultivo *in vitro*, las diferentes especies de HECM deben probar su efectividad en ensayos de inoculación con las especies forestales de interés (Chávez *et al.* 2007). Es aconsejable utilizar las diferentes fuentes de inóculo que de las especies fúngicas se puedan obtener, y los ensayos deben replicar el mayor número de condiciones de cultivo en vivero y las inherentes a los sitios de plantación (Pereira *et al.* 2007, Garza-Ocañas 2014). Mediante pruebas de diferentes combinaciones hongo-planta-sitio es posible determinar las mejores combinaciones que redunden en mayor productividad (Quiroz Marchant *et al.* 2009). Pero la calidad de la planta debe ser determinada mediante la evaluación del comportamiento de variables o características morfológicas y fisiológicas de plantas influenciadas por la micorrización controlada y otras prácticas culturales durante la producción en vivero (Fernández *et al.* 2003, Rincón *et al.* 2005).

Ritchie (1984), menciona que las características morfológicas significan forma y estructura. Las características morfológicas más comúnmente citadas son: altura, diámetro del cuello de la raíz, peso o volumen de la planta y sus partes aérea y de raíz, además de características subjetivas como el vigor del follaje, tallo sin deformaciones, raíz fibrosa y ausencia de plagas y enfermedades (Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo 2004). Ritchie (1984), agrupó los procedimientos para la evaluación de la calidad de planta en dos categorías (atributos materiales y atributos de comportamiento). Los atributos materiales incluyen a las características morfológicas y fisiológicas que pueden medirse directamente en las plantas, como la altura, diámetro del cuello de la raíz, el peso seco aéreo y radical, el contenido de nutrientes en el follaje y el contenido de agua en la planta. Los atributos de comportamiento son aquellos que se utilizan para evaluar la respuesta a condiciones particulares de prueba; por ejemplo, el potencial de emisión de nuevas raíces y la resistencia al estrés (Fisher y Mexal 1984, Duryea 1985) (Tabla 1.1). La evaluación de variables morfológicas es el procedimiento más sencillo para establecer el control de calidad de plantas producidas en vivero, debido a que requiere de medidas que se hacen con equipos sencillos en vivero o en campo.

Tabla 1.1 Atributos funcionales y tests empleados en el control de calidad de plantas forestales y estudios científicos. En cursiva los atributos más utilizados y en cursiva negrita los atributos utilizados en este estudio.

Atributos o variables de calidad de planta		
Morfológicos	Fisiológicos	Del comportamiento
<u>Cuantitativos</u>	<i>Concentraciones de nutrientes</i>	<i>Potencial de formación de nuevas raíces</i>
<i>Altura parte aérea</i>		
<i>Diámetro al cuello de raíz</i>	<i>Concentración de azúcares de reserva</i>	<i>Resistencia a heladas</i>
<i>Biomasa aérea y radical</i>	<i>Letargo de yemas terminales</i>	Resistencia a la desecación (test de vigor de OSU ¹)
<i>Esbeltez de los tallos (altura / diámetro)</i>	<i>Fluorescencia de pigmentos fotosintéticos</i>	
Proporción entre la biomasa aérea y la radical	<i>Liberación de electrolitos en raíces finas</i>	
<i>Índice de Dickson</i>	<i>Conductancia estomática y tasa de fotosíntesis</i>	
Longitud de yemas	Termografía foliar por infrarrojos	
<u>Cualitativos</u>	Emisión de compuestos volátiles inducidos por estrés	
<i>Plantas con heridas no cicatrizadas</i>	Estima del vigor con colorantes vitales	
<i>Plantas parcialmente o totalmente secas</i>	Concentración de clorofilas	
<i>Tallos con fuertes curvaturas</i>	Potencial hídrico	
<i>Tallos múltiples</i>		
<i>Tallos con muchas guías</i>		
<i>Tallos y ramas con parada vegetativa incompleta</i>		
<i>Tallos desprovistos de una yema terminal sana</i>		
<i>Inexistencia de ramificaciones o claramente insuficiente</i>		
<i>Follaje reciente y cuello de raíz dañado</i>		

1. Oregon State University. Tomado y modificado de Villar-Salvador (2003). Fuente. Elaboración propia.

Las características comúnmente evaluadas al momento de la cosecha de plantas (Thompson 1985) son:

Altura (cm). Es un indicador de la superficie fotosintética y del área de transpiración que define la capacidad para almacenar carbohidratos.

Diámetro (mm). El diámetro al cuello de la raíz es la característica de calidad más importante, posee la mejor relación con la supervivencia y crecimiento de la planta en campo.

Peso seco o biomasa seca aérea y radical (g). Representa la cantidad de materia seca que se formó en esta parte durante el crecimiento de la planta. Es un indicador de la eficiencia fisiológica en el desarrollo de la planta.

Relación altura/diámetro (IR). También llamado índice de robustez o esbeltez, y relaciona la altura de la planta (cm) con el diámetro del cuello de la raíz (mm) y son deseables los menores valores posibles. Específicamente valores numéricos menores a seis sugieren plantas más robustas.

El índice de calidad de Dickson (ICD). Es una medida integrada de los rasgos morfológicos (Johnson y Cline 1991), se considera un buen indicador de la calidad de planta, su cálculo computa robustez y distribución de biomasa (Fonseca *et al.* 2002). A mayor valor del índice mayor será la calidad de la planta (Dickson *et al.* 1960), se calcula con la fórmula siguiente:

$$ICD = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco aéreo (g)}}{\text{Peso seco radical (g)}}}$$

Porcentaje de micorrización (PM). Existen varias metodologías para el cálculo de este porcentaje. Se asume que plantas con altos porcentajes de colonización micorrícica tienen mayores posibilidades de supervivencia y desarrollo en los sitios de plantación (Brundrett *et al.* 1996b, Alarcón y Ferrera Cerrato 1999). En el presente estudio el PM resultó de la razón del número de ápices de raíces micorrizadas entre la suma total de ápices de raíces micorrizadas y no micorrizadas (Carrera-Nieva y López-Ríos 2004), como se ve a continuación:

$$PM = \frac{\text{Ápices micorrizados}}{\text{Ápices micorrizados} + \text{Ápices no micorrizados}} \times 100$$

En condiciones controladas, en vivero o en los sitios de plantación, los hongos micorrícicos permiten una mayor captación de agua a través de su micelio externo (Morte *et al.* 2001), y debido a esto pueden modificar las relaciones hídricas de la planta hospedante (Nelsen 1987). Una mejora en las relaciones hídricas de la planta supone como consecuencia una mejora en su estado nutricional y ambas reflejadas en una fotosíntesis sostenida mejorando el rendimiento de toda la planta (mayor crecimiento) (Augé 2001, Landhäusser *et al.* 2002). Los

experimentos en macetas han sido una herramienta importante para determinar las relaciones hídricas de las micorrizas basándose en comparaciones entre plantas micorrizadas y no micorrizadas como un modelo útil para estudiar los efectos de la micorrización (Lehto y Zwiazek 2011). La mayor parte de los estudios de inoculación con hongos micorrícicos muestran que los beneficios de la micorrización se ven potencializados, especialmente, bajo condiciones de estrés hídrico y limitación de nutrientes; sin embargo, el papel de las micorrizas es poco conocido especialmente durante sequías prolongadas y repetidas (Read y Boyd 1986, Sánchez-Díaz y Honrubia 1994, Lehto y Zwiazek 2011).

Aunque, es ampliamente reconocida la influencia positiva de la micorrización sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadas, y que bajo condiciones de estrés hídrico las plantas micorrizadas mantienen tasas de fotosíntesis altas en comparación con plantas no micorrizadas (Domínguez *et al.* 2001, Beniwal *et al.* 2010), existen pocos trabajos que demuestren la efectividad de los HECM sobre la tasa de fotosíntesis (A_N) y variables de intercambio gaseoso. En general se asume, que las plantas micorrizadas cuentan con la actividad del micobionte para suministrar nutrientes y agua, difícilmente disponibles sin la micorrización (Mousain *et al.* 1997). La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas captan y utilizan la energía de la luz para transformar la materia inorgánica absorbida del medio en materia orgánica, la cual es utilizada para su crecimiento y desarrollo (Teskey *et al.* 1994, Fernández y Gyenge 2010). Este proceso es dependiente de las condiciones de la planta, específicamente de su estado hídrico y suele variar en sus tasas en función de las condiciones climáticas (Harrington 1999). La tasa de fotosíntesis altamente dependiente de las condiciones de luz, temperatura y la disponibilidad de agua (Teskey *et al.* 1994, Lambers *et al.* 1998, Gracia-Alonso *et al.* 2004). En ambientes con alta radiación, temperatura y baja disponibilidad de agua, como en las zonas mediterráneas, suele ocurrir un fenómeno conocido como fotoinhibición, este implica una reducción de la eficiencia en la conversión fotoquímica de luz en biomasa debido a la reducción en la ganancia de carbono (Werner *et al.* 2001). La fotoinhibición puede ocasionar el cierre de estomas como consecuencia del aumento de la temperatura de la hoja bajo alta radiación, aunque este mecanismo no es del todo perjudicial para la planta, aun existiendo una pérdida potencial de carbono esta conseguirá disminuir la pérdida de agua por las hojas (Teskey *et al.* 1994, Werner *et al.* 2001, Casierra-Posada 2007).

Existe una estrecha relación entre el intercambio gaseoso y el déficit hídrico, ya que tanto la entrada de CO₂ como la salida de agua se produce a través de los estomas, y por tanto se puede decir que la pérdida de agua es una consecuencia inevitable que está ligada a la asimilación de CO₂ (Yu *et al.* 2001, Ewers 2013, Renninger *et al.* 2015). La planta al sufrir estrés hídrico cierra sus estomas, y como consecuencia no capta CO₂, y por tanto, no fija la energía luminosa (Medrano *et al.* 2002, Israelsson *et al.* 2006, Hernandez *et al.* 2016). Las plantas tienen que equilibrar ambos procesos para optimizar la ganancia de carbono con la menor pérdida de agua posible. A partir de la idea de cómo se da este equilibrio surge el concepto de eficiencia del uso del agua (*EUA*), que es el cociente entre la tasa de fotosíntesis y la tasa de transpiración; de tal forma, refleja la cantidad de agua perdida por los estomas en relación al carbono asimilado. Cuanto mayor sea este cociente, más eficientes serán las hojas en el uso del agua y perderán menos agua por carbono asimilado, lo cual es una ventaja en ambientes donde el agua es un recurso limitado (Li y Wang 2003, Jones 2004, Medrano *et al.* 2007). La *EUA* a escala foliar es el cociente de la transpiración y la fotosíntesis neta. La eficiencia de la transpiración es igual a la asimilación de CO₂/ transpiración (A/E , $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$) y la eficiencia intrínseca en el uso del agua igual a asimilación de CO₂/conductancia estomática (A/g , $\mu\text{mol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$) (Martín-Benito *et al.* 2010). Las dos formas de medir la *EUA* tienen las mismas unidades, pero difieren en que la eficiencia de la transpiración depende de la planta y de las condiciones ambientales; mientras que la eficiencia intrínseca mide diferencias relacionadas con la capacidad de la hoja para regular la fotosíntesis y la conductancia estomática, independientemente de las condiciones atmosféricas en el momento de la medición. Ambos parámetros tienen la limitante que son medidas instantáneas, integran un período breve de tiempo, por lo que su extrapolación a la *EUA* de la planta entera presenta la doble dificultad de relacionar parámetros medidos a escalas organizacional y temporal diferentes (Medrano *et al.* 2007, Bacon 2009, Medrano *et al.* 2009, Solarte *et al.* 2010). Una herramienta para la selección de especies forestales con buen comportamiento ante el estrés hídrico puede ser el estudio del efecto de parámetros de intercambio gaseoso como la fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración sobre la *EUA*, no obstante existen discrepancias sobre cuáles son lo más apropiados dado que el crecimiento y uso de agua varían en función de la especie, la edad y de las interacciones con el medio ambiente (Pardos Carrión 2007, Silva *et al.* 2017).

Entre los parámetros morfológicos de la hoja que potencialmente influyen en la EUA (A_N/g_s), se encuentra el área de masa foliar (LMA) (Medrano *et al.* 2009). La relación entre la masa seca de la hoja y el área foliar ('Masa foliar por área', LMA en gm^{-2}) se entiende como el costo a nivel foliar de la interceptación de luz (Gutschick y Wiegel 1988), ya que los costos respiratorios de la construcción y mantenimiento no están incluidos (Poorter *et al.* 2009). El LMA es un rasgo clave en el crecimiento de las plantas (Lambers y Poorter 1992) y un indicador importante de las estrategias de plantas (Grime 2002, Westoby *et al.* 2002), y se ha utilizado ampliamente en ecología vegetal, agronomía y silvicultura. Bajo condiciones controladas el LMA varía fuertemente con la luz, la temperatura e inundación, moderadamente con la concentración de CO_2 y el estrés hídrico y nutricional, y escasamente bajo la mayoría de otras condiciones (Niinemets 2001, Poorter *et al.* 2009). Existen diversos mecanismos por los cuales una LMA alta o baja puede contribuir al éxito de una especie de planta dada en el campo, con importantes consecuencias para los procesos del ecosistema. La LMA es parte de un complejo de rasgos, y nuestra comprensión mecanicista de los factores genéticos y fisiológicos que determinan este éxito es aún limitada y el entender la respuesta de las plantas a su entorno todavía representa un gran desafío (Niinemets 1999, Poorter *et al.* 2009). De manera que en diversas especies, los efectos más importantes en condiciones de déficit hídrico es la reducción en fotosíntesis (A_N), la conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) (Herralde Travería 2000, Peña-Rojas *et al.* 2004). Existen estudios fisiológicos realizados en diversas especies que han determinado que la disponibilidad de agua puede alterar en gran medida el área foliar, y por tanto, la tasa de fotosíntesis, el patrón de distribución de biomasa, y en consecuencia, la productividad de la planta (Galmés *et al.* 2007a, Medrano *et al.* 2009).

El oxígeno y dióxido de carbono (CO_2) son intercambiados con el ambiente por la apertura y el cierre de los estomas (Roelfsema y Hedrich 2005), ya sea aumentando o reduciendo la conductancia estomática, la velocidad a la que se intercambian agua y CO_2 , o velocidad a la que se moviliza el agua transpirada de las hojas hacia la atmósfera (Siam *et al.* 2008). La adquisición de CO_2 y el intercambio de oxígeno son fundamentales para que se desarrollen los procesos de fotosíntesis y respiración de las plantas (Casson y Gray 2008, Taiz y Zeiger 2010). La apertura de los estomas provoca la pérdida de agua de la planta en forma de vapor (transpiración). La absorción de CO_2 para la fotosíntesis implica que las plantas expongan

superficies húmedas (hojas) a una atmósfera seca y como consecuencia sufran la pérdida de agua por evaporación. No obstante, la pérdida de agua a través de las hojas sirve a la planta para disipar calor y mantener una temperatura estable para la fotosíntesis (Patishtán Pérez *et al.* 2010). El contenido de humedad de las plantas cambia constantemente y depende de la humedad disponible en el sustrato de crecimiento y en el ambiente, si una planta ésta sometida por mucho tiempo a estrés hídrico, se alteran los procesos de asimilación de CO₂ y de transpiración, lo que da como resultado que la fotosíntesis cese al igual que el crecimiento de la planta (Siam *et al.* 2008). En campo, la demanda hídrica no es igual en todos los suelos, y la captación de agua del suelo por las plantas está determinada por el control fisiológico de la pérdida de agua a través de una combinación de fluctuaciones en la conductancia estomática y la cantidad de follaje (Zweifel *et al.* 2007, Cosgrove y Holbrook 2010).

Dentro de las variables de intercambio gaseoso, la conductancia estomática (g_s) relaciona el flujo de agua transpirada a través del estoma con la fuerza motora del mismo (Siam *et al.* 2008), y es una variable importante para evaluar el estado hídrico de la planta, el balance de energía y las relaciones fotosintéticas (Casson y Gray 2008). La g_s regula el intercambio de vapor de agua - dióxido de carbono entre las hojas y la atmósfera (Casson y Gray 2008, Vico *et al.* 2013). Esta se utiliza como un indicador de estrés que es influenciado por las variaciones en el déficit de presión de vapor (VPD), la concentración atmosférica de CO₂, temperatura de la hoja (T), y el nivel de luz (Q) (Vico *et al.* 2013). La g_s depende de los factores ambientales del entorno tales como la radiación solar, la temperatura del aire, déficit de saturación del aire, potencial hídrico foliar y la concentración externa de CO₂ (Chaerle *et al.* 2005, Katul *et al.* 2012, Berrones y Oyarzún 2013). Los estomas desempeñan un papel crucial en el equilibrio entre la pérdida de agua y ganancia de carbono, crucial para la producción de biomasa. Por esta razón, la estimación de la apertura estomática, es de importancia en estudios de producción de biomasa, en los que se busca maximizar la eficiencia del uso del agua (Hetherington y Woodward 2003, González-Rodríguez *et al.* 2011).

La habilidad de las plantas para controlar la apertura de los estomas les permite responder de forma rápida a los cambios ambientales (Hetherington y Woodward 2003), como para evitar la pérdida excesiva de agua e incluso limitar la absorción de contaminantes líquidos o gaseosos

a través de los estomas (Radin *et al.* 2010). Una gran pérdida de agua provocará la deshidratación de la planta, para evitar esto, las plantas han desarrollado hojas con epidermis cuyas cutículas son impermeables con diversas formas y distribución de los estomas (Raven 2002, Roelfsema y Hedrich 2005, Galmés *et al.* 2007a). La transpiración, se define como la pérdida de vapor de agua de una hoja u otro órgano de las plantas. La tasa de transpiración depende de tres factores importantes 1) el déficit de presión de vapor entre la hoja y el aire, 2) la resistencia que ofrezca el aire o capa de frontera que rodea a la hoja y 3) la resistencia que ofrezca la hoja (Cosgrove y Holbrook 2010). Las reducciones en g_s pueden causar una reducción en la tasa de transpiración (E). Las reducciones en E causan una desaturación parcial del aire adyacente a la vegetación y el menor enfriamiento por evaporación de las hojas resulta en un aumento de la temperatura de la hoja, superior a 40 °C y las temperaturas óptimas para la fotosíntesis en general son menores a los 30 °C; debido a esto, ambos factores incrementan la demanda evaporativa (Jarvis *et al.* 1999, Radin *et al.* 2010).

La disponibilidad de agua, es la principal limitante para el establecimiento de plantaciones y en el manejo forestal en bosques naturales. La supervivencia de las plantas terrestres depende de la capacidad de las raíces para obtener agua y nutrientes del suelo (Cassab y Sánchez-Guevara 2011, Prieto-Ruíz *et al.* 2012, Brunner *et al.* 2015). Los efectos del cambio climático, obligan al desarrollo de modelos de gestión en plantaciones forestales en los cuales la ocurrencia de sequía es constante, y cuyos efectos se agudizan cuando la radiación y la temperatura alcanzan sus máximos anuales. Esto condiciona todos los procesos fisiológicos y demográficos que tienen lugar en una plantación, como el control estomático y las relaciones de competencia entre individuos (Hanson y Weltzin 2000, Zavala *et al.* 2005, Michelozzi *et al.* 2011). Son muchos los factores que influyen en el establecimiento exitoso de especies forestales en campo, las cuales tienen diferentes requerimientos y por su capacidad de aclimatación a las condiciones medioambientales del sitio, la disponibilidad de agua, nutrientes y luz son los requerimientos más importantes que deben ser tomados en cuenta (Díaz *et al.* 2008). Por esta razón es necesario contar con parámetros que sirvan de referencia para la selección de especies y los sitios apropiados para su establecimiento. Uno de estos parámetros es la conductancia estomática (g_s), la cual a pesar de verse afectada por diversos factores, que no deben ser ignorados, no deja de ser un parámetro de referencia que ayuda a

conocer el nivel de estrés soportado por diferentes especies y poder relacionarla con su adaptación y productividad. Diferentes especies, ocupan diferentes mecanismos para hacer frente a las condiciones de falta de humedad (Birchler *et al.* 1998, Chaves *et al.* 2002, Corcuera *et al.* 2005, Pita *et al.* 2013).

En relación a la producción de planta en vivero un aspecto a estudiar es el efecto de las prácticas culturales que ahí se aplican y su repercusión en la supervivencia de las plantas en campo (Birchler *et al.* 1998, Villar-Salvador *et al.* 2013). Prácticas como el preacondicionado por sequía en vivero, induce la aclimatación al estrés hídrico a través de mecanismos como el ajuste osmótico, desarrollo de la raíz y aumento de la capacidad fotosintética (Prieto Ruíz *et al.* 2004, Guo *et al.* 2010, Prieto-Ruíz *et al.* 2012, Villar-Salvador *et al.* 2013). Se espera que estos mecanismos mejoren el desempeño de las plántulas establecidas en zonas propensas a la sequía. Sin embargo, el pre-acondicionamiento de largo plazo implica envejecimiento de las plantas en vivero (Birchler *et al.* 1998, Ávila-Flores *et al.* 2014). En diversos trabajos de micorrización controlada se evalúa el crecimiento a través de parámetros morfológicos o fisiológicos de calidad de planta, pero casi siempre por separado. Estudiar de forma integral el crecimiento de plántulas a través de la evaluación de parámetros de estructura y forma de la planta, junto con variables de intercambio gaseoso relacionadas en el proceso de producción de biomasa vegetal puede ser ventajoso al momento de determinar el efecto de la inoculación micorrízica sobre la calidad de plantas inoculadas con HECM en comparación con plantas no inoculadas. Es difícil definir la calidad de las plántulas de pino en los viveros forestales desde un punto de vista holístico, por esta razón creemos que el estudio de uno o más atributos morfológicos que incluyen parámetros físicos pueden proporcionar información más exacta sobre la calidad de las plantas micorrizadas y no micorrizadas producidas en vivero.

Al conocer el estado hídrico de las plantas se puede conocer el contenido de humedad del suelo disponible en la zona radicular de la planta o cultivo y las condiciones de demanda evaporativa imperantes al momento de la medición (Ferreyra *et al.* 2006, Podestá *et al.* 2010). El estado hídrico de las plantas se puede medir evaluando el potencial hídrico xilemático a través de un método rápido y sencillo, el potencial xilemático corresponde a la tensión con que se encuentra agua en el xilema de la planta y se mide en unidades de presión, normalmente en megapascal

(MPa). Los valores medidos son expresados como negativos, en función de que el agua en el xilema de las plantas se encuentra a presiones inferiores a la atmósfera (Selles y Ferreyra 2006, Raggio y Moro 2008). El instrumento de medición que sirve para determinar el potencial hídrico xilemático se llama cámara de presión o bomba de Schölander. La cámara de presión proporciona una medida de la presión hidrostática negativa que se produce en el xilema de una planta intacta debido a la evaporación de agua desde el tejido por transpiración y a las resistencias al movimiento del agua desde el suelo hasta el tejido (Schölander *et al.* 1965, Ritchie y Hinckley 1975). El potencial hídrico estimado con la cámara de presión es el valor negativo de la presión requerida para comenzar a obtener líquido en la superficie expuesta del xilema a presión atmosférica (Raggio y Moro 2008, Kirkham 2014). El tejido se debe encontrar en condiciones de equilibrio de potencial hídrico para efectuar una estimación adecuada de su potencial hídrico promedio (Meiri *et al.* 1975, Raggio y Moro 2008).

Existe un amplio campo de oportunidad para estudios relacionados con la eficiencia de los HECM en la mejora del desempeño de los parámetros fisiológicos en vivero y en los sitios de plantación. Al respecto, algunos autores mencionan que aún en situación de disponibilidad hídrica no está clara la influencia de la micorrización en el potencial hídrico de plantas inoculadas, y función de esto, resulta interesante estudiar la influencia de la inoculación con HECM sobre los parámetros morfológicos y fisiológicos de plantas bajo condiciones de estrés hídrico con el objeto de aplicar los resultados en repoblaciones forestales en sitios con suelos pobres en nutrientes y baja disponibilidad hídrica (Domínguez-Núñez *et al.* 2004). El presente trabajo contiene resultados del proceso de manipulación biotecnológica en laboratorio y de aplicación en condiciones de vivero de diferentes especies de hongos ectomicorrícicos que crecen asociadas a plantaciones adultas de *Pinus radiata* en la Región del Biobío, Chile. Además de su caracterización a través de cultivos *in vitro*, se utilizaron esporas como fuente de inóculo para la micorrización controlada de plantas de especies del género *Pinus*. Bajo la premisa de que la simbiosis micorrícica mejora las relaciones hídricas y la nutrición de las plantas hospedadas, lo que supone un mayor crecimiento, se monitoreó el comportamiento de variables morfológicas (altura, diámetro del cuello de la raíz, biomasa seca aérea y radical, porcentaje de copa viva e índices de Dickson y de robustez) y de variables fisiológicas (tasa de fotosíntesis, conductancia estomática, potencial hídrico y *LMA* y *EUA*) de plantas de pino

micorrizadas y no micorrizadas; y en base a los resultados determinar si la simbiosis micorrícica inducida representa un beneficio durante su cultivo en vivero y bajo diferentes condiciones de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo.

Hipótesis general

- La importancia ecológica de las micorrizas radica principalmente en que mejoran la nutrición de las plantas al aumentar la capacidad de absorción de agua del suelo y con ella nutrientes minerales esenciales. Sin embargo, factores como la temperatura y pH del suelo afectan el desarrollo de los hongos micorrícicos. En un ensayo con cepas de los hongos ectomicorrícicos *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* se observó que a temperaturas de 28 a 32°C el crecimiento de tres cepas de estos hongos *in vitro* es afectado negativamente, aunque la especie menos afectada fue *R. luteolus*. A mayores temperaturas existe mayor déficit hídrico, por tanto la micorrización controlada con esporas de *R. luteolus* y *S. luteus* tendrá efectos positivos sobre el comportamiento de los atributos de crecimiento de plantas en especies del género *Pinus* bajo diferentes niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo, debido a que éstas demuestran mejor capacidad de crecimiento independiente de las temperaturas probadas.

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la micorrización controlada de los hongos ectomicorrícicos *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* sobre los atributos del material y del comportamiento de calidad de planta en las especies *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* al cultivarse en condiciones controladas y en vivero.

Objetivos específicos

- Analizar el comportamiento *in vitro* de las especies *R. luteolus*, *S. granulatus* y *S. luteus* bajo condiciones controladas de temperatura de incubación y pH del medio de cultivo.
- Evaluar el efecto de la micorrización controlada con las especies *R. luteolus*, *S. granulatus* y *S. luteus* sobre el comportamiento de variables morfo-fisiológicas en plantas de *P. canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* en condiciones controladas de cultivo.
- Determinar el efecto de diferentes niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo en vivero sobre el comportamiento de parámetros morfo-fisiológicos en plantas micorrizadas y no micorrizadas de *P. canariensis* y *P. pinaster*.



CAPÍTULO II

Metodología general

El proyecto se desarrolló progresivamente en tres etapas que se llevaron a cabo en diferentes condiciones: Etapa I. Campo y laboratorio; Etapa II. En laboratorio y Etapa III. En ambiente controlado y en vivero (

Figura 2.1):

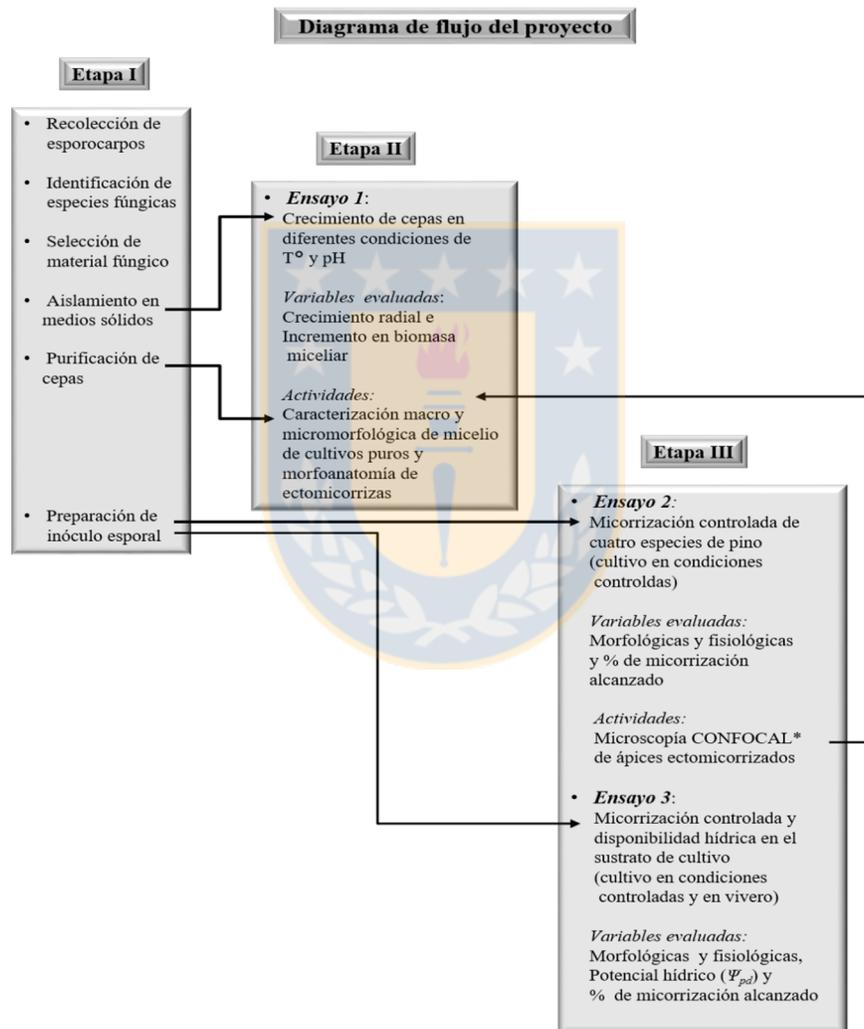


Figura 2.1 Desarrollo progresivo del proyecto, ensayos y actividades realizadas, variables analizadas y ambiente de cultivo. Las flechas indican conexión de actividades entre las etapas; (*) los resultados se reportan con los resultados de una etapa anterior. Fuente: Elaboración propia.

Etapa I

La etapa se inició con recolección de cuerpos fructíferos de los hongos ectomicorrízicos (HECM) *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* en plantaciones adultas de *Pinus radiata* D. Don establecidas en sitios cercanos a Los Ángeles en la provincia del Biobío, VIII Región, Chile (37° 20' 42.58" S, 72° 17' 55.15" O), durante los meses de junio a septiembre de la temporada 2013, 2014 y 2015. Se continuó con la identificación de las especies fúngicas a través de las características macroscópicas y microscópicas de sus carpóforos.

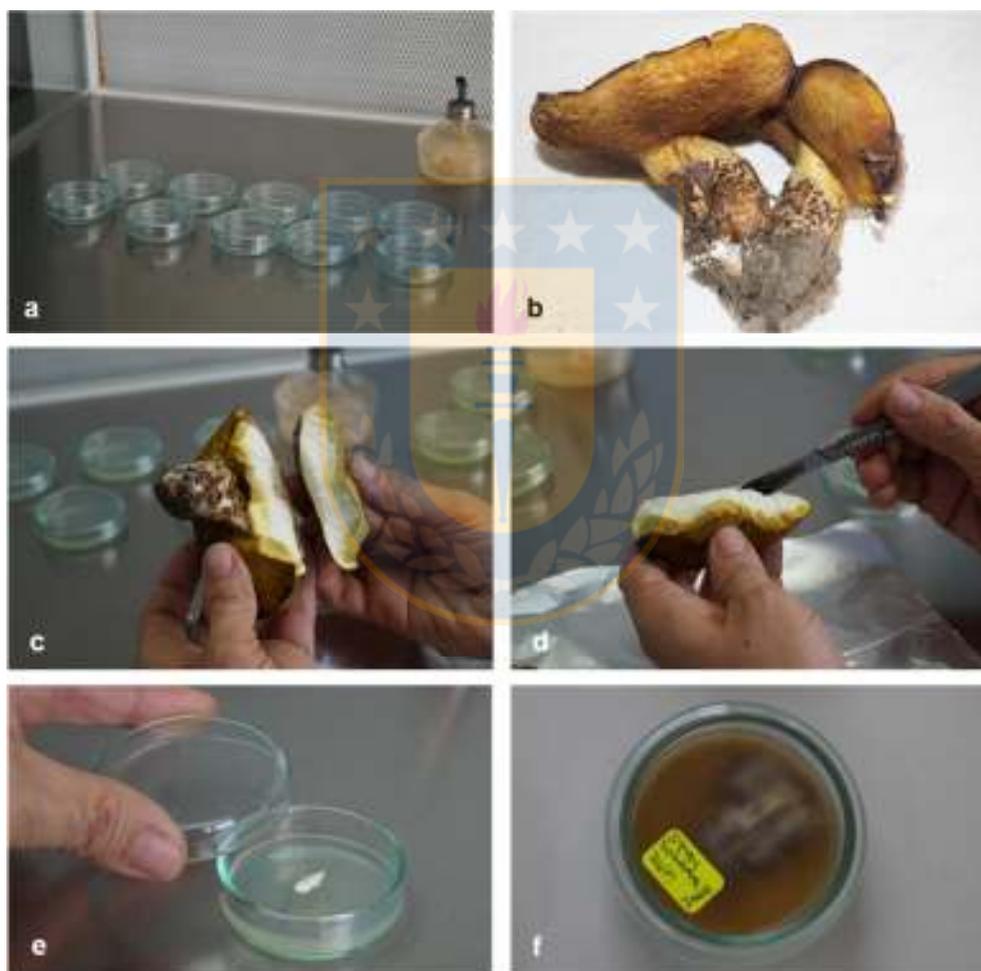


Figura 2.2 Placas Petri de 50 mm de diámetro con PDA como medio de cultivo. (1) Aislamiento utilizando carpóforos de *Suillus* sp. (a y b trozos por placa) ejemplificando el proceso para obtención de las cepas de los hongos ectomicorrízicos *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* (c a f). Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, en condiciones axénicas se realizaron aislamientos en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con pH ajustado a 5.8 y 24°C como temperatura de incubación (cultivos stock). Discos de agar-micelio extraídos de las cepas aisladas se transfirieron a nuevas placas Petri con PDA y pH ajustado a 5.8, para completar el proceso de aislamiento y purificación para obtener cepas puras (Figura 2.2).

Por último, carpóforos frescos de los HECM *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus*, previamente seleccionados, se licuaron en agua destilada estéril hasta obtener suspensiones esporales madre (de altas concentraciones), se envasaron y mantuvieron en oscuridad a 5°C para su conservación. Previo ajuste de las concentraciones esporales, estas suspensiones esporales se utilizaron en la micorrización de plantas destinadas a los *Ensayos 2 y 3* (Figura 2.3).



Figura 2.3 Producción de inoculantes a partir de los carpóforos recolectados en plantaciones adultas de *Pinus radiata*. (a); licuado en agua destilada estéril (c), suspensiones esporales madre (de alta concentración) (b); envasado y conservación en refrigeración (b y c). Elaboración propia.

Etapa II

Al iniciar esta etapa ya se contaba con cepas purificadas de cada una de las especies de hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus*. Con estas cepas se instalaron dos experimentos independientes pertenecientes al Ensayo 1, en el primero se evaluó la temperatura de incubación; y en el segundo, el pH del medio de cultivo. Las temperaturas de incubación probadas fueron 24, 28 y 32 °C y los valores de pH del medio de cultivo MMN ensayados fueron 4.8, 5.3, 5.8, 6.3 y 6.8.

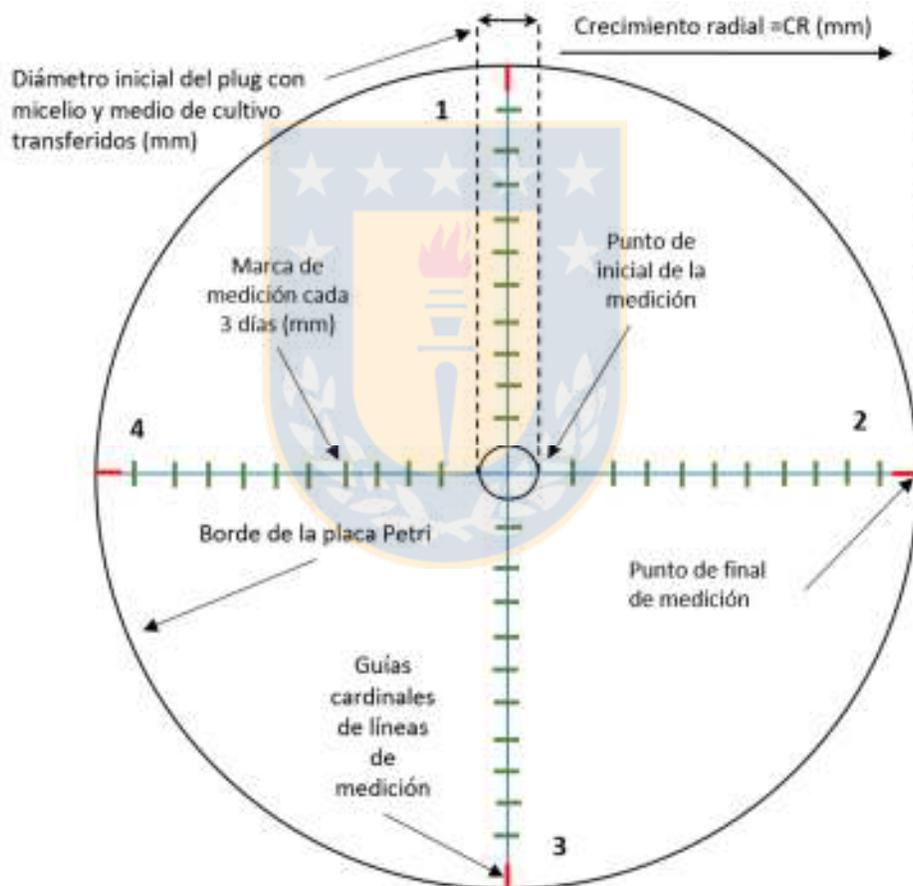


Figura 2.4 Diagrama del reverso de una placa Petri que ilustra el método utilizado para la medición de la variable crecimiento radial promedio de las cepas de los hongos ectomicorrícicos *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* cultivadas *in vitro*. Las mediciones se realizaron en el sentido de las manecillas del reloj iniciando en el punto (1). Fuente: Elaboración propia.

Se determinó la velocidad media de crecimiento radial (VMCR) para cada una de las temperaturas y pH ensayados. Para lo anterior fue necesario medir el crecimiento radial (mm) de las colonias por el reverso de las placas (en cuatro direcciones que pasaron por el centro de las colonias) marcas roja. El promedio de crecimiento radial por día fue igual al promedio de la distancia de las cuatro marcas verdes al día de medición. La medición finalizaba cuando alguna de las especies llenaba el total del diámetro de una de sus placas. Los datos obtenidos fueron ajustados mediante una ecuación de regresión lineal para calcular la pendiente de la curva de crecimiento correspondiente a la velocidad media de crecimiento de cada especie fúngica, expresada en mm día^{-1} (Figura 2.4). Al final del periodo de cultivo a cada tratamiento y especie de hongo se midió el incremento en biomasa micelial (IBM) (mg) para los ensayos de temperatura y pH, la recuperación de esta biomasa producida en las placas de Petri se realizó por filtración.

Como se muestra en la

Figura 2.1, las siguientes actividades formaron parte de la Etapa II y III respectivamente, y los resultados obtenidos en cada una de ellas se reportan de forma conjunta, por ser complementarios, en el Capítulo III del presente trabajo. Este acomodo fue en función de la oportunidad y pertinencia en cuanto a la disposición del material fúngico y vegetal.

Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas in vitro

La caracterización macro y microscópica del micelio de *Rizhopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* se realizó en cepas purificadas de siete y 30 días de crecimiento. La caracterización macroscópica fue visual a ambos lados de la placa con una lupa estereoscópica Olympus® SZ61 por medio de la cual se observaron y describieron las características morfológicas como el color de la cepa, textura, forma, tipo de margen y tipo de crecimiento. La caracterización microscópica se hizo por medio de un microscopio óptico Olympus® CX31 con cámara acoplada Moticam® 2000 (2.0 M Pixel USB 2.0). Se tomaron en cuenta el tamaño y forma de las hifas, ramificaciones, presencia de hifas moniliformes o submoniliformes, células engrosadas, presencia de fíbulas y anastomosis. Se hicieron preparaciones temporales, utilizando rojo Congo

como medio de contraste para la toma de microfotografías con la cámara acoplada al microscopio, aunque el material fotográfico se presenta en escala de grises.

Caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas

A partir de los sistemas radicales pertenecientes a material vegetal (de 12 meses de cultivo) correspondiente al ensayo del Capítulo V del presente trabajo, se tomaron raíces de tres plantas por tratamiento inoculadas con la concentración esporal 1×10^7 , pero sólo de las inoculaciones con las especies de HECM por separado en cada especie de pino. Simultáneamente al proceso de evaluación del % PM se seleccionaron ápices radicales micorrizados por medio de una lupa estereoscópica de alta resolución Olympus modelo SZ2-ILST® acoplada a cámara digital Moticam® 2000, 2.0 MPixel USB 2.0 e iluminador de fibra óptica HGY3. Con estos equipos se realizó la observación y registro fotográfico de las ectomicorrizas formadas en cada combinación micobionte-fitobionte. La observación de las características morfoanatómicas se hizo con una lupa estereoscópica, se registraron color, textura del manto fúngico, presencia o ausencia de rizomorfos y la textura del micelio externo observado sobre los ápices ectomicorrícicos. El material fotográfico obtenido con lupa estereoscópica y cámara acoplada, fue posteriormente procesado con el software ImageJ 1.49 v/Java 1.6.0_24 (64-bit) con el que se midieron las estructuras ectomicorrícicas.

La caracterización micromorfológica se hizo mediante el registro microfotográfico de preparaciones semifijas de cortes histológicos transversales de ápices radicales de cuatro especies de pino ectomicorrizados con los HECM *R. luteolus* y *S. luteus*. Las microfotografías se obtuvieron con Microscopio Confocal Zeiss Modelo LSM780, Laser de Ex. Diodo 405 nm / espectro de emisión: 410-590 nm utilizando los objetivos: 1). LD LCI PlanApoChromat 25X NA 0.8; 2). Plan ApoChromat 40X NA 1.3 y 3). Plan ApoChromat 63X NA 1.4 para obtener imágenes compuestas para diferentes planos del corte denominado Zstack: 25-50 μm / Scaling Z: 1.5 μm . Las imágenes obtenidas se procesaron con el software Zen Black ® 2012 para seleccionar un solo plano, sobre este plano se realizó el contraste de imagen, la observación de estructuras, determinación del tipo de agregado celular, medición del diámetro de hifas del manto y grosor del manto fúngico. De tres cortes diferentes por combinación hongo-pino se

obtuvieron 30 mediciones por estructura, y se realizó un análisis de varianza al 95% de confiabilidad al conjunto de datos obtenidos.

Etapa III

Esta etapa del proyecto estuvo integrada por dos ensayos (*Ensayos 2 y 3*). Para el desarrollo de ambos ensayos se utilizaron las suspensiones esporales madre elaboradas a partir de carpóforos frescos en la Etapa I. *Ensayo 2*. A partir de la dilución de suspensiones madre u originales (alta concentración de esporas) de los hongos ectomicorrízicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* Fr., y *Suillus luteus* L. Gray, se realizaron conteos de esporas y el ajuste de las concentraciones esporales a probar por medio de una cámara de recuento Neubauer (hematocitómetro). Así se elaboraron suspensiones esporales a concentraciones 1×10^7 y 1×10^8 denominadas C1 y C2, respectivamente. En esta etapa no se probó a *S. granulatus* por ser la especie con menores valores medios de las variables de crecimiento en cultivo *in vitro*. Se utilizaron plántulas de *P. canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* obtenidas a través de siembra en almácigos, inoculadas y sin inocular. Para el establecimiento del *Ensayo 2*, de los almácigos de cada especie, se seleccionaron plántulas 5 cm de altura promedio. Las plántulas seleccionadas fueron trasplantadas a envases de poliestireno expandido con 30 cavidades de 170 mL de capacidad por cavidad, las cavidades se rellenaron con composta de corteza de pino.

La micorrización con las cargas esporales C1 y C2 se realizó en dos dosis, iniciando un mes posterior al trasplante, cuando el sistema de raíces de las plántulas presentó raíces secundarias. Cada dosis se aplicó en tres puntos alrededor de las plantas, y entre las dosis uno y la dosis dos hubo un mes de diferencia. El ensayo se llevó a cabo en condiciones controladas dentro de una cámara de crecimiento. Las plantas se cultivaron durante 12 meses, al término de los cuales, las variables morfológicas evaluadas fueron: diámetro del cuello de la raíz (DAC) (mm), la altura (ALT) (cm), peso seco de la parte aérea (PSA) (g), peso seco de la raíz (PSR) (g), peso seco total (PST) (g), el índice de calidad de Dickson (ICD) y el porcentaje de micorrización (PM) (%). Las variables instantáneas de intercambio gaseoso fueron: tasa de fotosíntesis (A_N) y conductancia estomática (g_s). Ambas variables se evaluaron entre 9 y 13 h en un conjunto de acículas correspondientes al tercer tercio superior de cuatro plantas seleccionadas

aleatoriamente por cada tratamiento. Se utilizó un sistema analizador de intercambio gaseoso (Li-6400XT Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA).

Ensayo 3. Las especies de pino para este ensayo se seleccionaron en función de los resultados del Ensayo 2, se utilizaron plántulas de *Pinus canariensis* y *P. pinaster* obtenidas a través de siembra en almácigos. La semilla recibió tratamientos por flotación por 48 horas y desinfestación con H₂O₂ al 30% en agitación constante por 15 minutos. Plántulas seleccionadas se trasplantaron a envases de poliestireno y fueron inoculadas con soluciones esporales de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* Fr., y *Suillus luteus* L. Gray. La recolección de carpóforos se realizó en plantaciones adultas de *Pinus radiata* D. Don creciendo en las cercanías de las Ciudad de los Ángeles, Chile. Con carpóforos frescos seleccionados de los HECM *R. luteolus* y *S. luteus* por separado, se prepararon suspensiones esporales a 1×10^7 de concentración. La inoculación de las plantas fue en dos dosis, uno y dos meses después del trasplante. El cultivo de las plantas fue en dos etapas, en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa; en el invernadero existió solo el control de la cantidad de agua de riego. Se utilizaron envases de poliestireno expandido de 170 mL llenos con una mezcla de vermiculita, corteza compostada, perlita y turba (2:2:1:1, v/v) previamente esterilizada. Posterior al cultivo en condiciones controladas, las plantas se colocaron en un invernadero y bajo malla rashell de 60% de cobertura, para su aclimatación. Terminada la aclimatación se retiró la malla rashell. Se seleccionaron plantas según sus características morfológicas (altura y diámetro de cuello), sanas y libres de daños. Se trasplantaron a bolsas de polietileno negro con sustrato arenoso (suelo natural), como el existente en los sitios de plantación y recolección de HECM (Figura 2.6).

Se proporcionó otro tiempo de aclimatación al sustrato de cultivo previo al inicio del ensayo. El riego durante este tiempo fue cada dos días a capacidad de campo (-0,03 MPa). Se fertilizó una vez cada dos semanas a nivel del sustrato con mezcla Anasac® (NPK 11-10-15, Ca (6.6) Mg (5.0) y S (3.0) Santiago, Chile) (1g Litro⁻¹). Pasado este período se establecieron tres tratamientos diferenciados por nivel de disponibilidad hídrica del suelo de acuerdo con su curva de retención de humedad. Para iniciar el ensayo se establecieron dos condiciones con gradientes de humedad contrastantes: la primera como tratamiento control (T0), con riego a capacidad de

campo (-0.01 a -0.03 MPa); y la otra de sequía, en la que se eliminó por completo el riego y para disminuir progresivamente la cantidad de agua disponible para las plantas en el sustrato. Se establecieron dos bloques por especie de pino, con nueve tratamientos con dos repeticiones por bloque y cinco plantas por tratamiento.

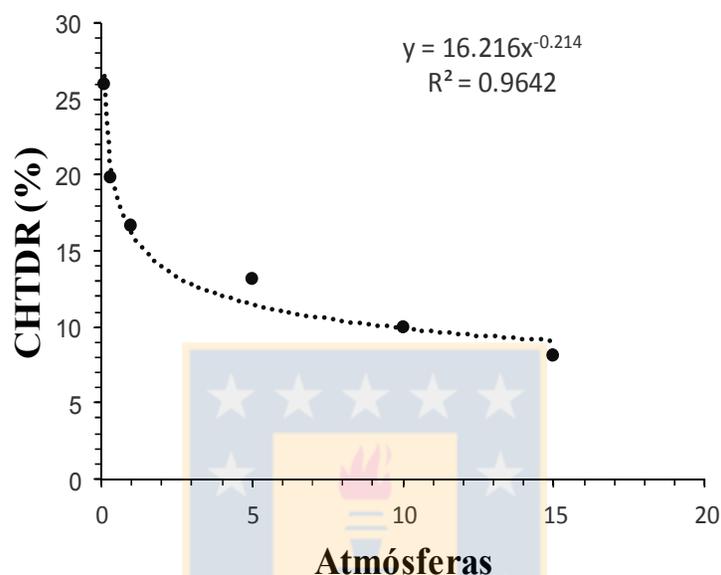


Figura 2.5 Calibración del equipo TDR con el contenido de humedad real y gravimétrico asociados a la curva de retención de humedad del suelo utilizada para establecer los niveles de disponibilidad hídrica del suelo. Fuente: Elaboración propia.

El monitoreo del contenido de humedad del suelo se hizo cada dos días con un TDR (Time Domain Reflectometry) previamente calibrado en base al contenido de humedad gravimétrico (CHW, g de agua / g de sustrato) de muestras de sustrato a distintos niveles de humedad, los cuales fueron posteriormente asociados con la curva de retención de humedad del suelo que estableció los potenciales hídricos del sustrato (ψ_{sustrato}) críticos para el ensayo. A partir de la disminución del contenido de humedad en la condición de sequía, se determinaron tres puntos o valores de muestreo en los cuales se evaluó el comportamiento fisiológico de las plantas de cada especie (inoculadas y no inoculadas), probadas en el experimento. Cada punto de muestreo se estableció como el contenido de humedad del suelo, registrados en el tratamiento de sequía, equivalente a valores de potencial hídrico del sustrato de -0.03 MPa (T0), -1.0 MPa (T1) y -1.5

MPa (T2) (Figura 2.6). Los análisis se realizaron en base a %HBSS (porcentaje de humedad base suelo seco).

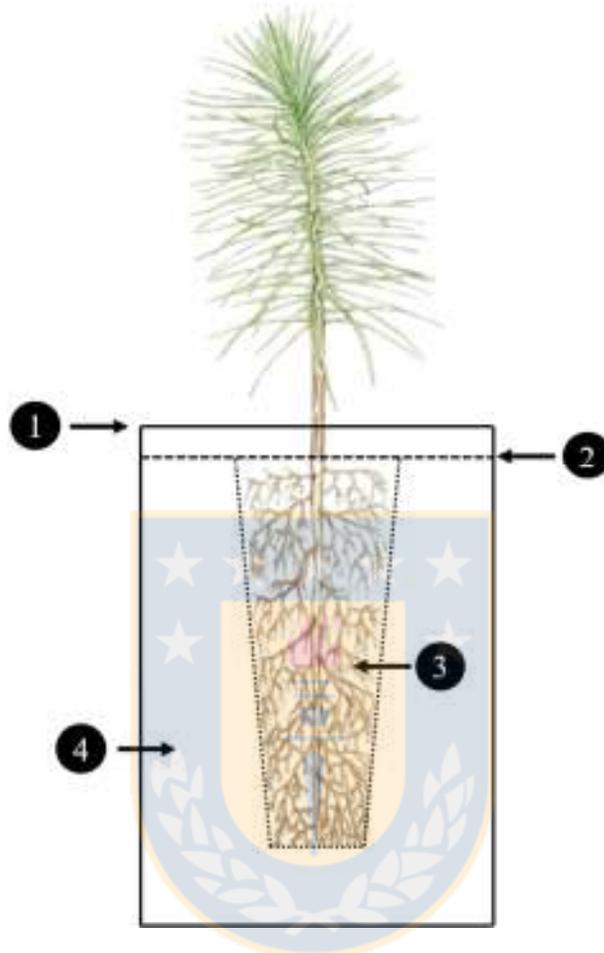


Figura 2.6 Plantas de *Pinus* sp. trasplantadas a bolsas de polietileno negro de 1500 mL de capacidad. (1) rellenas con sustrato arenoso (suelo natural). Nivel del suelo de cultivo (2); cepellón original (sustrato + raíces) (3) formado durante el cultivo en condiciones controladas (cámara de crecimiento); sustrato arenoso (suelo natural) (4). El peso seco de raíces nuevas (PSRN) (g), obtenido solo a partir de las raíces post- trasplante crecidas en el área (4). El PST (g) se obtuvo de la suma de las raíces de (3 + 4). Al momento de retirar el sustrato se cortaron las raíces fuera del cepellón original (4), después de obtener peso seco (g) se sumó su peso al de las raíces de cepellón original (3).

En total fueron 24 meses de cultivo, las variables morfológicas evaluadas fueron: altura (ALT) (cm) medida desde el cuello de la raíz a la yema apical, diámetro del cuello de la raíz (DAC)

(mm), porcentaje de copa viva (% CV) porción de la parte aérea total ocupada por hojas vivas, peso seco aéreo (PSA) (g), peso seco de raíz (PSR) (g), peso seco de raíces nuevas (PSRN) (g) peso de las raíces que crecieron post-trasplante a partir del pan de tierra original (Figura 2.6), índice de robustez (IR) que resulta de la razón de la ALT (cm) entre DAC (mm). Se calculó el índice de calidad de Dickson (ICD) y el porcentaje de micorrización (% PM). El PM se calculó para las raíces de plántulas de *P. canariensis* y *P. pinaster*. En ± 60 cm de raíces primarias, tras la eliminación del sustrato de crecimiento, se seleccionaron raíces de segundo y tercer orden en las que se determinó el número de ápices radiculares micorrizados y no micorrizados. El PM es el resultado de la razón del número de ápices micorrizados entre la suma de ápices micorrizados y no micorrizados. Las variables fisiológicas evaluadas fueron: el potencial hídrico pre-alba (Ψ_{pd}), que se midió con bomba de presión tipo Shölander. La medición se realizó en el tercio superior del tallo de tres plantas por tratamiento siguiendo el procedimiento estándar detallado en el capítulo VI. Para la medición de la tasa de fotosíntesis instantánea (A_N) y conductancia estomática (g_s) se utilizó un sistema analizador infrarrojo de intercambio gaseoso. Previa determinación de las curvas de luz para ambas especies de pino se fijaron los parámetros de saturación lumínica, temperatura, flujo de aire y concentración de CO₂. La eficiencia en el uso de agua (EUA) se calculó como el cociente entre la tasa neta de fotosíntesis y la conductancia estomática (A_N/g_s). También se determinó la masa foliar por área (LMA) o “*Leaf mass area*”. El área foliar se determinó mediante el procesamiento de imágenes con el software especializado y la masa seca con horno de ventilación forzada.

Los resultados del proyecto ayudarán a:

- Establecer el grado de compatibilidad entre las especies de fitobiontes y micobiontes propuestas.
- Conocer la temperatura y pH de cultivo adecuados para el cultivo *in vitro* de las los HECM estudiados.
- Determinar si existe influencia positiva o negativa en función del porcentaje de micorrización sobre la calidad morfológica y fisiológica de las plantas de las especies de pino propuestas, así como de las mejores combinaciones hongo-fitobionte de acuerdo a las condiciones de cultivo utilizadas en el proyecto.

Los resultados serán útiles como fuente de información para la implementación de programas masivos de inoculación micorrízica en la producción de planta en viveros forestales.



CAPÍTULO III

Caracterización de colonias *in vitro* y de las ectomicorrizas formadas por *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *Suillus luteus* en el sistema radical de *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata*

Resumen

La simbiosis micorrícica es indispensable para las especies del género *Pinus*, estudios *in vitro* y de síntesis micorrícica permiten conocer la capacidad de diferentes especies de hongos ectomicorrícicos (HECM) para formar simbiosis con plantas de este género. En este estudio se describen las características macro y microscópicas del micelio de cepas aisladas de carpóforos de los HECM *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* recolectados en plantaciones *Pinus radiata* en la Región del Biobío, Chile. El aislamiento, purificación y caracterización de las cepas se hizo en papa dextrosa agar (PDA) a 5.8 de pH a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se realizó también la caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas formadas entre estos HECM y plantas de *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* cuya síntesis micorrícica se realizó aplicando suspensiones esporales. La caracterización se hizo a los 12 meses posteriores a la inoculación. Los dos géneros de HECM probados resultaron ser de fácil aislamiento y manipulación biotecnológica en laboratorio. Existieron diferencias en las características macro (color, textura, margen de la colonia) y microscópicas (dimensiones de la estructura miceliar) entre cepas de los géneros *Rhizopogon* sp. y *Suillus* sp. En cultivo puro *S. granulatus* formó rizomorfos, mientras que *S. luteus* produjo gran cantidad de exudados adheridos a las paredes hifales. *R. luteolus* + *P. pinea* fue la única combinación que presentó ramificación tipo coraloide, todas las demás combinaciones hongo-pino presentaron ramificaciones dicotómicas simples. Todas las combinaciones produjeron rizomorfos siendo *S. luteus* + *P. pinaster* fue la que mayor cantidad produjo. El mayor grosor de manto fúngico se observó en *R. luteolus* + *P. pinea* ($73.97\pm 3.24\ \mu\text{m}$), los menores valores coincidentemente con *P. pinaster* con *R. luteolus* ($16.41\pm 0.79\ \mu\text{m}$) y *S. luteus* ($29.38\pm 1.08\ \mu\text{m}$). Todas las especies de HECM probadas tienen potencial relevante en la micorrización controladas de las especies del género *Pinus* utilizadas.

Palabras clave: Cepas, micelio, hifas, ectomicorrizas, *Pinus*.

Introducción

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista de enorme importancia en la producción de plantas forestales (Rentería-Chávez *et al.* 2017) y se utiliza en programas de reforestación a gran escala para mejorar la nutrición, el crecimiento y la adaptación de las plantas al sitio de plantación (El Karkouri *et al.* 2005). En el vivero y en plantación, después de la inoculación artificial, a menudo se observan efectos diferenciales en la supervivencia y el crecimiento de las plantas (Stenström y Ek 1990, Le Tacon *et al.* 1992), ciertos hongos producen mayores beneficios que otros en función de la especie hospedera (Chávez *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2012, Castrillón *et al.* 2015). Por tanto, es indispensable la identificación de los HECM aplicados o establecidos de forma natural en los viveros, esto ayuda a determinar el estado micorrícico, el efecto de la micorrización en vivero y su posterior efecto en los sitios de plantación (El Karkouri *et al.* 2005). La identificación es clave para la selección de las combinaciones óptimas de micobiontes y fitobiontes en la inoculación exitosa de plantas forestales (Chávez *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2012, Castrillón *et al.* 2015).

Las identificaciones en terreno son posibles gracias a los carpóforos, la parte reproductiva del hongo que sobresale a la superficie (hongos epigeos) o semienterrada (hongos hipogeos). En general, dependiendo del tipo del hongo, su micelio está bajo el suelo, en la madera, o en otras fuentes de alimento, este crece y se diferencia hasta producir cuerpos fructíferos (Ardón-López 2007). El micelio es un entramado de finos filamentos llamados hifas es la parte viviente del hongo. Los hongos son heterótrofos, utilizan carbono orgánico como fuente de energía (Frioni 1999), esto facilita su cultivo en medios nutritivos artificiales haciendo posible su estudio. Esta técnica desarrollada por Melin (1921) y sus adaptaciones (Norkrans 1949, Lamb y Richards 1970) permite identificar y confirmar la capacidad de los hongos para producir micorrizas con especies arbóreas seleccionadas (Ekwebelam 1977). Los cultivos derivados de esporocarpos pueden ser identificados con relativa facilidad (Lamb y Richards 1970). Mucha de la investigación sobre los hongos micorrícicos y la condición micorrícica se ha realizado a través de cultivos fúngicos derivados de esporomas de hongos basidiomicetes ECM que fructifican en rodales forestales (Melin 1936, Hacskaylo 1953, Bryan y Zak 1961, Lamb y Richards 1970). El estudio de las características macro y microscópicas del micelio en cultivos puros, así como de

los morfotipos resultantes de la síntesis micorrízica entre diferentes especies de micobiontes y fitobiontes es esencial para reconocimiento de las especies, en particular cuando no se dispone de cuerpos fructíferos. Además, facilita la selección de los micobiontes más efectivos para la introducción de especies forestales exóticas (Ekwebelam 1977).

Las especies de pino (*Pinus*) se utilizan en todo el mundo como especies de interés forestal por su madera y por ser fuente de celulosa para la fabricación de papel (Chapela *et al.* 2001). *Pinus radiata* D. Don (Pinaceae) es una especie arbórea nativa del ambiente costero californiano introducida en Chile hace más de un siglo. Actualmente, es la base de la industria forestal en diferentes países del hemisferio sur (Guerrero y Bustamante 2007). El área mundial total plantada con esta especie excede los 4.3 millones de hectáreas y sigue en expansión en Australia, Chile, Nueva Zelanda, Sudáfrica y España (Lewis *et al.* 1993, Lavery y Mead 1998, Sutton 1999, Toro y Gessel 1999, Sarrionandia *et al.* 2015). La especie se establece en un amplio rango latitudinal de 33 - 41°S en sitios que difieren tanto en precipitación, temperatura y características del suelo (Guerra *et al.* 2005). *Pinus canariensis* Chr. Smith ex. DC., es una especie de conífera endémica de las Islas Canarias, se desarrolla en rodales cerrados, en bosques abiertos de sabana desde 1800 m hasta el límite del bosque a 2000 - 2100 m (Gieger y Leuschner 2004). Esta especie se ha utilizado en plantaciones con el fin de aumentar la densidad de rodales y en la protección contra la erosión (Salas 1994). Su aprovechamiento maderable es limitado, pero puede crecer en terrenos jóvenes (malpaises) rocosos y con escasa materia orgánica, es resistente al fuego y crece relativamente rápido (Arévalo *et al.* 2005).

Pinus pinea L. es una especie nativa de la región mediterránea europea, cuyas plantaciones durante el siglo pasado se extendieron más allá de sus países de origen (España, Portugal, Italia, Grecia, Albania y Turquía) (Nergiz y Dönmez 2004), con fines de restauración forestal y reconversión de tierras agrícolas (Boutheina *et al.* 2013). En la Meseta Castellana (España), se mejoró genéticamente por su importancia ecológica y por su producción de piñones comestibles con alto valor nutricional y culinario (Loewe *et al.* 2018). En esta región se utilizó en programas de restauración de la cubierta vegetal para combatir la erosión (Mutke *et al.* 2000). *Pinus pinea* posee baja variabilidad en los parámetros de crecimiento, alta plasticidad fenotípica (capacidad de adaptación) y baja variabilidad genética en tolerancia a la sequía (Mutke *et al.* 2008, Sánchez-

Gómez *et al.* 2009). En Chile se introdujo a inicios del siglo XX como árbol forestal para la estabilización de arenas costeras (Albert 1909), en programas de repoblación forestal y desarrollo rural (Loewe y Delard 2012). Desde la década de 1990 se evalúa su potencial como cultivo alternativo para la zona mediterránea chilena (Loewe *et al.* 2012, Loewe *et al.* 2015). *Pinus pinaster* Ait., llamado también pino marítimo es una de las especies más importantes en el suroeste de Europa, utilizado a menudo en programas de reforestación, por su amplia distribución geográfica e importancia económica (Fernandes y Botelho 2004); en Portugal el 23% del área forestal está ocupada por esta especie (Sousa *et al.* 2012). En la cuenca mediterránea esta especie prospera en sitios propensos a la sequía con suelos arenosos con baja capacidad de retención de humedad. Tiene un papel clave en la conservación del hábitat de “dunas boscosas” (Dubos *et al.* 2003, Dubos y Plomion 2003). En el Mediterráneo occidental *P. pinaster* ocupa un rango geográfico relativamente pequeño, pero tiene mayor amplitud ecológica en cuanto a disponibilidad hídrica utilizándose como especie modelo de estudio de respuesta al estrés en coníferas (Eveno *et al.* 2007, Perdiguero *et al.* 2012, Perdiguero *et al.* 2013). Es menos tolerante a la sombra que *P. pinea* (Awada *et al.* 2003).

En suelos arenosos de la Región del Biobío en Chile, hongos ectomicorrícicos (HECM) como *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* crecen asociados a árboles de *P. radiata* y poblaciones silvestres fructificando de forma abundante (Pereira *et al.* 2007). Se ha demostrado que *R. luteolus* y *S. luteus* mejoran el rendimiento y el establecimiento de la planta bajo estrés hídrico (Castellano 1996, Atala *et al.* 2012, Chávez *et al.* 2014). Además, varias especies del género *Suillus* sp. conocidas como boleto o callampa de pino son comercializadas a nivel mundial por ser comestibles y de buena calidad por lo compacto de su carne y discreto rendimiento (Fabian-Veliz 2012). Valdebenito (2015) menciona que *Suillus luteus* representa el 70% de las exportaciones de hongos Chilenos, tiene presencia en mercados internacionales en Francia, España e Italia (Barros *et al.* 2006). El género *Rhizopogon* es uno de los que contiene especies con tolerancia a la sequía debido a que varias de ellas cuentan con micelios externos fuertes que producen gran cantidad de rizomorfos (Brownlee *et al.* 1983, Boyle y Hellenbrand 1991, Duñabeitia *et al.* 2004).

En las áreas de plantación de *P. radiata* en Chile las sequías son cada vez más recurrentes y severas debido al cambio climático, se piensa que éste reducirá cada vez más las precipitaciones en el futuro. En estos sitios, la mortalidad de las plántulas post trasplante podría elevarse debido a la tensión excesiva. En estas condiciones, la micorrización de plantas podría ser una estrategia posible para mantener la silvicultura en esta área en el futuro. Por tanto, es necesario mantener tasas adecuadas de crecimiento y a viabilidad económica de las plantaciones del género *Pinus*. En este sentido, el papel de las ECM en el suministro de recursos a los árboles en crecimiento, así como la comprensión de la diversidad y sensibilidad de las asociaciones ectomicorrícicas tienen gran importancia práctica y ecológica (Addison *et al.* 2017). A pesar de no ser un enfoque nuevo, el manejo apropiado de las relaciones suelo-planta-microorganismos sigue siendo un enfoque promisorio en el manejo biotecnológico para lograr sistemas agrícolas y forestales estables y productivos a largo plazo (Barea *et al.* 1996, Varela y Trejo 2001). Debido a lo anterior en el presente trabajo se estudiaron las características macro y microscópicas del micelio de cepas aisladas a partir de trozos de carpóforos de los HECM *Rhizopogon luteolus* Fr., *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *Suillus luteus* L. Gray *in vitro* y de las ectomicorrizas que producen en las raíces de *Pinus canariensis* Chr. Smith ex. DC, *P. pinea* L., *P. pinaster* Ait, y *P. radiata* D. Don. al inocular sus sistemas de raíces con esporas de estos hongos en suspensión.

Materiales y métodos

Material fúngico para caracterización in vitro

En plantaciones adultas de *Pinus radiata* D. Don creciendo en suelos arenosos de la Región del Biobío, Chile, se recolectaron carpóforos de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* Fr. (RL), *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *Suillus luteus* L. Gray, cuya identificación se hizo por sus características morfológicas de acuerdo con (Gerhardt *et al.* 2000, Calonge 2009, Lazo 2016). Se seleccionaron esporomas juveniles y físicamente íntegros (Torres 1992), de estos carpóforos se tomaron fragmentos de tejido de la parte del contexto para realizar aislamientos en una campana de flujo laminar (ESCO®, USA) de acuerdo con Kumar y Satyanarayana (2002), Domínguez-Romero. *et al.* (2013) y Murrieta-Hernández *et al.* (2014). Los fragmentos fueron depositados en placas Petri de 50 mm de diámetro (Ø) y con 10 mL de

medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (HiMedia®, India) ajustado a 5.8 de pH. Las placas se incubaron a 24±1°C (incubadora BINDER®, Alemania) en obscuridad hasta obtener micelio con crecimiento activo. De estas colonias iniciales se tomaron nuevos discos de micelio de 5.0 mm de diámetro y fueron transferidos a nuevas placas Petri de 50 mm de Ø con el mismo medio de cultivo y pH (Díaz *et al.* 2009), así se completaron los procesos de aislamiento y purificación (cultivos stock) para cepas identificadas de *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus*.

Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias

De los cultivos stock y durante la fase de crecimiento más activa, se tomaron discos de micelio de 5 mm de Ø, específicamente del área del margen de las colonias (Díaz *et al.*, 2009), se transfirieron a nuevas placas Petri de 90 mm de Ø y 20 mL de PDA (HiMedia, Mumbai, India) con pH ajustado a 5.8 y en obscuridad a 24±1°C (Sánchez *et al.* 2001) durante 30 días. La caracterización macro y microscópica de las cepas se realizó en etapa joven (siete días) y en etapa madura (30 días) observando micelio puro de *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus*. La caracterización macroscópica fue visual a ambos lados de la placa, con lupa estereoscópica Olympus® SZ61 se observaron y describieron las características morfológicas como el color de la cepa, textura, forma, tipo de margen y tipo de crecimiento (Hutchison 1991, Flores *et al.* 2008). La caracterización microscópica se hizo por medio de un microscopio óptico Olympus® CX31 con cámara acoplada Moticam® 2000 (2.0 M Pixel USB 2.0) en ella se tomó en cuenta el tamaño y forma de las hifas, ramificaciones, presencia de hifas moniliformes o submoniliformes, células engrosadas, presencia de fibulas y anastomosis (Sánchez *et al.* 2000). Se realizaron preparaciones temporales contrastadas con Rojo Congo en las que se tomaron microfotografías con microscopio y cámara acoplada, pero el material fotográfico se procesó a escala de grises.

Material vegetal, fúngico y síntesis micorrícica para caracterización de ectomicorrizas

Se utilizaron plantas de *Pinus canariensis* Chr. Smith ex. DC, *P. pinea* L., *P. pinaster* Ait, y *P. radiata* D. Don. se inocularon con suspensiones esporales elaboradas con esporocarpos de los HECM *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* apartados de la recolección inicial para este propósito. Por sus resultados en las pruebas de crecimiento *in vitro* *S. granulatus* fue excluida

de esta fase del trabajo. Se molieron carpóforos frescos y limpios de las dos especies de HECM restantes para obtener suspensiones esporales que se homogeneizaron adicionando un volumen variable de agua destilada hasta que las suspensiones tuvieran una densidad similar (suspensiones originales). Estas suspensiones se envasaron y etiquetaron para su conservación a 5°C, posteriormente de ellas, se tomaron 100 mL y se adicionaron 300 mL de agua destilada para que con ayuda de un hematocitómetro (cámara de Neubauer) realizar los conteos de esporas y obtener una concentración esporal (1×10^7) para los HECM *R. luteolus*, *S. luteus* por separado (Rincón *et al.* 2001, Lazarevic *et al.* 2012). La inoculación fue un mes posterior al trasplante, manteniendo las suspensiones esporales en agitación. De cada concentración esporal por especie y en combinación se aplicaron dos dosis de 6 mL de suspensión por planta utilizando una jeringa auto-dosificadora tipo pistola inyectable (Walmur®) de 10 mL de capacidad, considerando que el porcentaje de esporas viables decrece con el tiempo (Martínez *et al.* 2007). Cada dosis se aplicó inyectando la suspensión en tres puntos alrededor del tallo de las plantas, con un mes de diferencia entre las dosis uno y la dos.

Cultivo del material vegetal

Previo a su siembra, las semillas de pino se colocaron en flotación en agua por 48 h para el remojo de la testa y la eliminación de semillas vanas. La testa de las semillas se desinfectó por inmersión H_2O_2 al 30% en agitación constante durante 15 minutos, al final se lavaron con abundante agua destilada estéril. Las semillas se sembraron a ± 1.5 cm de profundidad en almácigos con vermiculita como sustrato de germinación. De los almácigos de cada especie se seleccionaron plántulas 5 cm de altura y se trasplantaron a envases de poliestireno expandido con 30 cavidades de 170 mL de capacidad rellenos con composta de corteza de pino como sustrato de cultivo. Los sustratos de germinación y cultivo fueron previamente esterilizados (autoclave marca Huxley 350) en intervalos de 1h por tres días consecutivos a 120°C y a 1 atm. En promedio cada tercer día se aplicaron 20 mL de agua en cada cavidad. La fertilización a nivel de sustrato fue cada cuatro meses aplicando la mezcla Anasac® (NPK 11-10-15, Ca (6.6) Mg (5.0) y S (3.0) Santiago, Chile) a una concentración de 1 g L⁻¹ de agua. Durante los 12 meses de cultivo las plantas crecieron al interior de una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16-8 (día-noche), $53 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR, de 75±10% de humedad relativa del aire (HR) y 24°C de temperatura ambiental.

Caracterización macro y microscópica de ectomicorrizas

A los 12 meses de cultivo, se seleccionaron ápices de raíces ectomicorrizadas (morfortipos) en los sistemas radicales de las plantas de cada especie con ayuda de una lupa estereoscópica de alta resolución (Olympus SZ2-ILST®) acoplada a cámara digital (Moticam® 2000, 2.0 MPixel USB 2.0) e iluminador de fibra óptica HGY3 para toma de fotografías en agua. Con la ayuda de estos equipos se realizó la observación y registro fotográfico de las estructuras ectomicorrícicas de cada combinación de especies de micobiontes y fitobiontes (Tabla 3.1) resultantes de la inoculación con suspensiones esporales. De igual forma, la observación de las características morfoanatómicas se hizo directamente con una lupa estereoscópica, se registraron color, textura del manto fúngico, presencia o ausencia de rizomorfos y la textura del micelio externo observado sobre los ápices ectomicorrícicos. El material fotográfico obtenido con lupa estereoscópica y cámara acoplada, posteriormente fue procesado con el software ImageJ 1.49 (Wayne Rasband/National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EE.UU.) a fin de determinar las dimensiones de las diferentes estructuras ectomicorrícicas.

Tabla 3.1 Combinaciones hongo-planta utilizadas para la caracterización de ectomicorrizas.

Combinaciones hongo-planta			
Micobionte	Fitobionte	Micobionte	Fitobionte
<i>Rhizopogon luteolus</i> (H1)	<i>Pinus canariensis</i> (P1)	<i>Suillus luteus</i> (H2)	<i>Pinus canariensis</i> (P1)
	<i>Pinus pinea</i> (P2)		<i>Pinus pinea</i> (P2)
	<i>Pinus pinaster</i> (P3)		<i>Pinus pinaster</i> (P3)
	<i>Pinus radiata</i> (P4)		<i>Pinus radiata</i> (P4)

H1...2 = número de especie de hongo y P1... 4 = número de especie de pino. Fuente: Elaboración propia.

La caracterización micromorfológica se realizó con fotografías de cortes histológicos transversales de los ápices ectomicorrizados, las fotografías fueron tomadas sobre preparaciones semifijas de ápices radicales de las cuatro especies de pino micorrizadas con las dos especies de HECM probadas. Después de seleccionar en agua los morfortipos de cada combinación micobionte-fitobionte, estos se fijaron con FAA (alcohol (al 70%), ácido acético glacial y formaldehído (CH₂O)) durante 24 h, después fueron transferidos a alcohol (al 70%) (Galindo-Flores *et al.* 2015). Una vez fijados se tomaron ápices radicales ectomicorrizados y con micrótopo se hicieron cortes transversales de 20-30 µm de grosor. Sobre los portaobjetos se colocaron series de varios cortes histológicos transversales con medio de montaje y se

protegieron con cubreobjetos. La observación y toma de microfotografías se realizaron con Microscopio Confocal Zeiss Modelo LSM780, Laser de Ex. Diodo 405 nm/espectro de emisión: 410-590 nm utilizando los siguientes objetivos: 1). LD LCI Plan Apo Chromat 25X NA 0.8; 2. Plan Apo Chromat 40X NA 1.3 y 3. Plan Apo Chromat 63X NA 1.4 para obtener imágenes compuestas para diferentes planos del corte, denominado Zstack: 25-50 μm /Scaling Z: 1.5 μm . Con el software Zen Black® 2012, se seleccionó un solo plano de las imágenes compuestas. En el plano seleccionado con las herramientas de medición del software se determinaron el tipo de agregado celular, diámetro de hifas y grosor de manto fúngico (Galindo-Flores *et al.* 2015). De tres cortes diferentes por combinación micobionte-fitobionte se obtuvieron 30 mediciones por estructura, con los datos obtenidos se realizó análisis de varianza al 95% de confiabilidad.

Resultados y discusión

Al igual que para estudios como el de Rincón *et al.* (1999) las especies de los géneros *Rhizopogon* y *Suillus* se aislaron fácilmente en cultivo puro. A diferencia de los autores mencionados, los aislamientos en el presente estudio fueron posibles en el 90% de los casos al primer intento, especialmente al utilizar carpóforos en un adecuado estado físico y etapa de maduración.

Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias

Rhizopogon luteolus Fr. (RL). En el haz de la placa Petri se observó micelio pardo-blanquecino, sobre todo en cepas jóvenes, o color crema con matices pardos blanquecinos, ocreos y grisáceos, tonos rosados en la madurez. El crecimiento de la colonia es de circular a ligeramente lobulado, con micelio aéreo postrado y sumergido de apariencia fibrosa, el aéreo de textura algodonosa a fibrosa, laxo (no apretado). Las hifas emanaron radialmente del centro (punto de inoculación) al borde de la colonia. A lo largo de éstas, se formaron estrías radiales que parten del centro de la colonia y hacia el margen exterior de la misma. En todas las colonias se observó la presencia de gúttulas cristalinas amarillentas a marrón claro u obscuro, más abundantes conforme aumenta la edad de las colonias. Se observaron de dos a tres zonas de crecimiento concéntricas con cambios de coloración en sus fronteras, poco evidentes en cepas jóvenes (Figura 3.1 (a y c)).

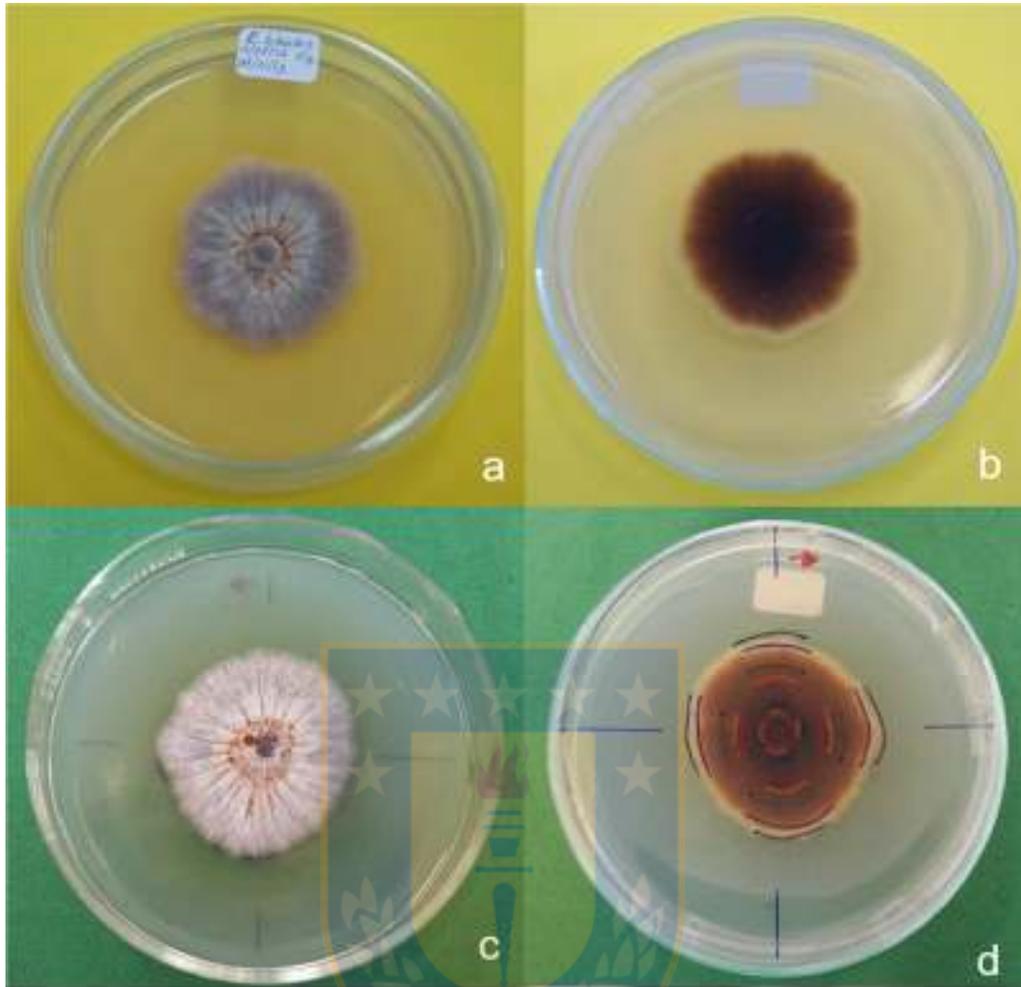


Figura 3.1 Haz y envés de placas Petri con cepas representativas con crecimiento micelial típico de *Rhizopogon luteolus* (Medio PDA, pH 5.8, $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad, 30 días de crecimiento *in vitro*). Fuente: Elaboración propia.

En el envés de la placa el medio se tornó color marrón oscuro, más intenso al centro y menos intenso hacia el margen. Al margen exterior de la colonia se puede apreciar una franja de color más claro. A diferencia de las cepas jóvenes (siete días de crecimiento), no se distinguieron zonas de crecimiento debido al cambio de coloración del medio; no obstante fue posible apreciar estrías radiales oscuras que emanan del centro hacia el margen de la colonia (b y d). Los micelios obtenidos en el presente estudio son coincidentes con los obtenidos en Melín Norkrans modificado (MNM) por Miller *et al.* (1983) y Torres y Honrubia (1993a), y con resultados muy similares a los obtenidos por Torres (1992) y Sánchez *et al.* (2000), aunque estos con *Rhizopogon roseolus* en MNM.

Al igual que Miller *et al.* (1983), Torres (1992) y Sánchez *et al.* (2000) con *Rhizopogon roseolus* en MNM se observaron hifas filamentosas de tipo tubular, alargadas, muy ramificadas en ocasiones en perpendicular, entremezcladas, hialinas de paredes delgadas, septadas, con engrosamientos intercalares al nivel de los septos y en su mayoría flexuosas. A diferencia de estos autores, se observó la presencia de fíbulas. Con incrustaciones en forma de cristales y pequeñas gotas de exudados amarillentos sobre la superficie de las hifas. El diámetro de las hifas varió de 1.0 a 5.0 μm , con presencia de anastomosis (Figura 3.2 (a, b, c y d)).

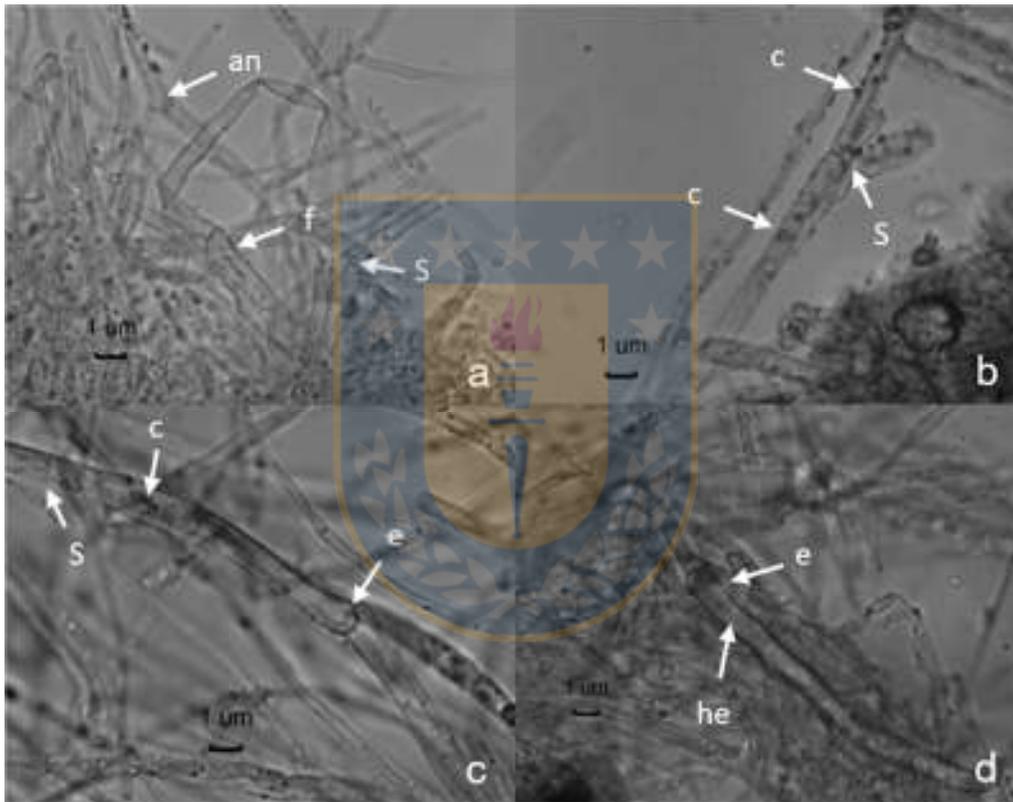


Figura 3.2 Estructuras del micelio de *Rhizopogon luteolus*, (Medio PDA, pH 5.8, $24\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, 30 días de crecimiento in vitro, imágenes tomadas de preparaciones temporales contrastadas con Rojo Congo)¹. Fuente: Elaboración propia.

¹ Abreviaturas Figuras (3.2, 3.4 y 3.6): **ag**= agregados (partículas sólidas adheridas); **an**= anastomosis; **c**= cristales; **e**= engrosamientos; **ex**=exudados (pigmentos incrustados sobre la pared); **f**=fíbulas; **he**=hifas engrosadas; **rm**=rizomorfos y **s**=septos.

Suillus granulatus (L.) Roussel. En el haz de la placa micelio pardo claro o blancuzco, con zonas irregulares de micelio aéreo color marrón claro a crema creciendo por encima de la colonia con textura algodonosa, afelpado y a veces granulosa al igual que Miller *et al.* (1983) y Torres (1992) en MNM. En algunos casos es el tipo de micelio predominante en color y textura, en otros el micelio crece denso y apretado en su mayoría postrado, originando una superficie tortuosa de la superficie del medio. Se observó gran cantidad de micelio sumergido altamente ramificado, el margen es de regular a ligeramente lobulado, rara vez circular y de color crema. Con presencia de gúttulas cristalinas de color marrón claro a oscuro, en cepas jóvenes y viejas (Figura 3.3 (a y b)).

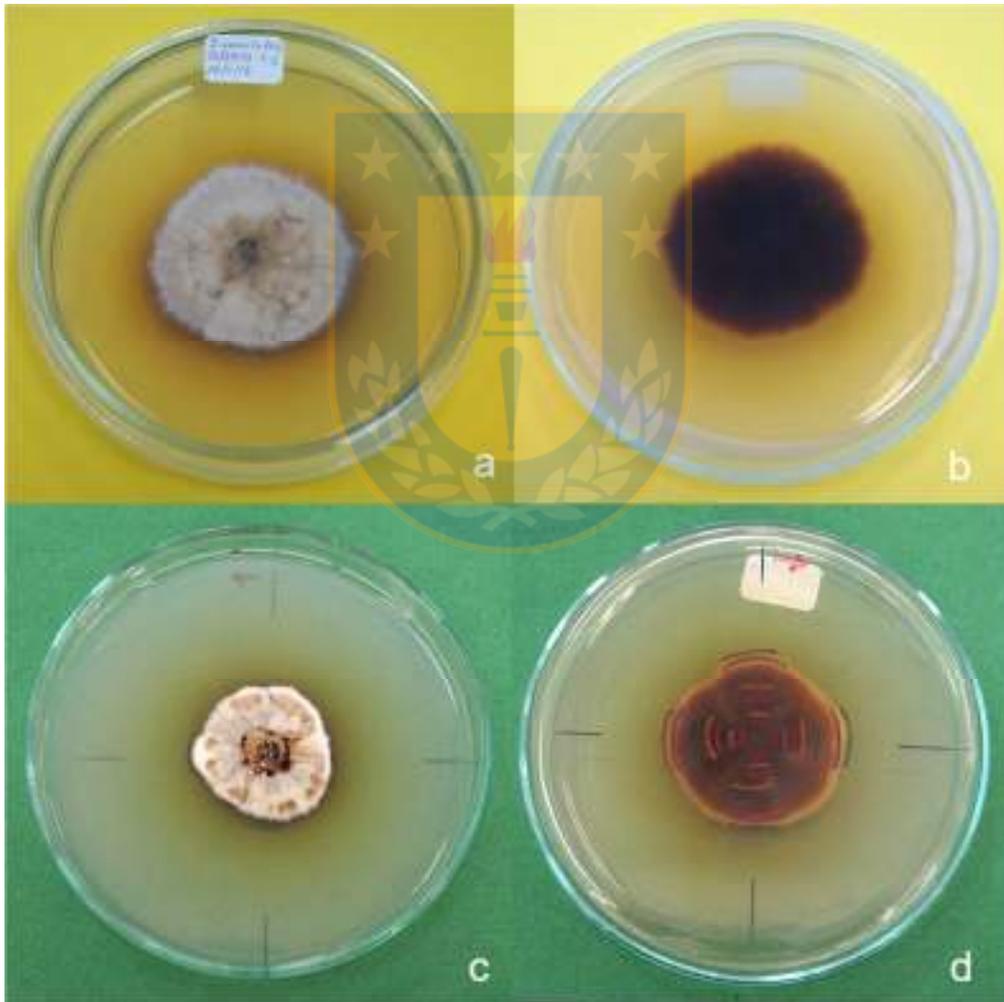


Figura 3.3 Haz y envés de placas Petri con cepas representativas con crecimiento miceliar de *Suillus granulatus* (Medio PDA, pH 5.8, $24\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, 30 días de crecimiento *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

Después de *S. luteus*, las cepas de esta especie fueron las que más cambiaron el color original del medio de cultivo. Se pudieron distinguir de dos a tres zonas de crecimiento concéntricas que suelen variar en coloración y textura dependiendo del tiempo de cultivo. En el envés de la placa, el medio de cultivo cambió de forma intensa su coloración a marrón oscuro, igual de intenso al centro y en el margen. Se pudo observar crecimiento de abundante micelio sumergido en forma circular irregular a lobulado. En cepas jóvenes (siete días de crecimiento), no fue fácil distinguir zonas de crecimiento debido al intenso cambio de coloración del medio; sin embargo, en cepas de un mes de crecimiento fue posible distinguir zonas concéntricas de crecimiento solo si el cambio de color fue leve (Figura 3.3 (c y d)). En general el micelio obtenido en el presente estudio coincide en características con el obtenido por Miller *et al.* (1983), Torres (1992) y Sánchez *et al.* (2000), pero diferencias en cuanto a color son apreciadas con los resultados de Torres y Honrubia (1993a) quienes observaron coloraciones pardo-rojizas diferentes a las observadas en el presente estudio.

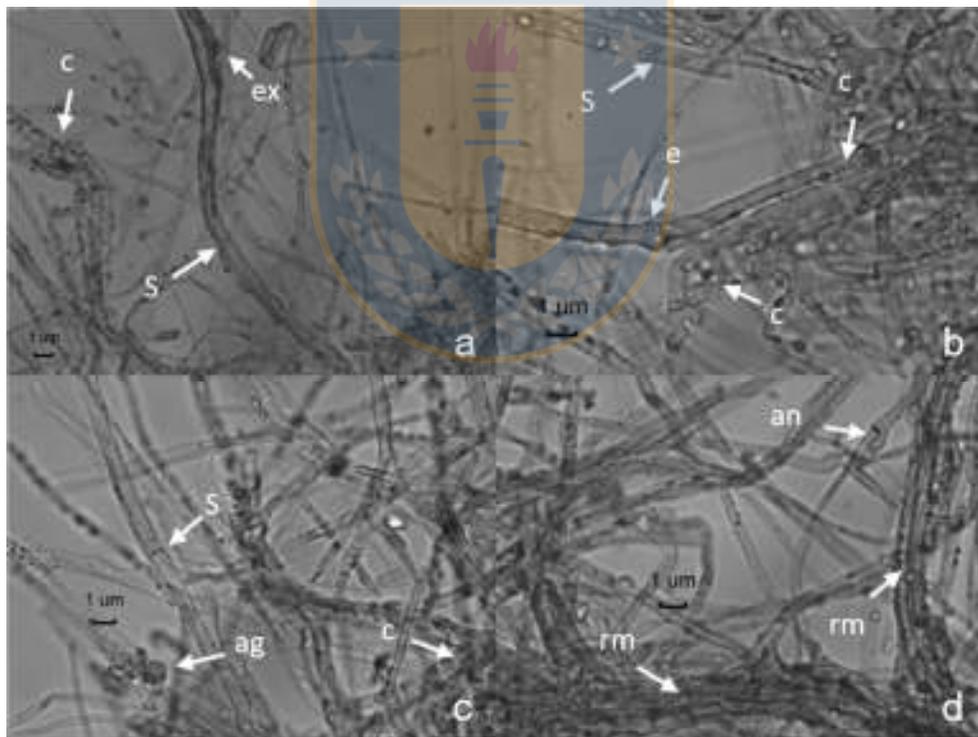


Figura 3.4 Estructuras del micelio de *Suillus granulatus* (Medio PDA, pH 5.8, $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, 30 días de crecimiento *in vitro*, imágenes tomadas de preparaciones temporales contrastadas con Rojo Congo). Fuente: Elaboración propia.

Las cepas de *S. granulatus* produjeron hifas hialinas filamentosas tubulares, ligeramente ramificadas de paredes finas o delgadas y en su mayoría en perpendicular, entremezcladas. Las hifas mostraron septos y escasa presencia de fibulas. Las hifas presentaron diámetros que variaron de 1.0 a 4.6 μm , también presentaron estrangulamientos y engrosamientos intercalares (entre tabiques o terminales) con diámetros que van de 9.0 a 25.0 μm ubicados junto a los septos o entre tabiques o terminales como reporta también Miller *et al.* (1983), Torres (1992) y Sánchez *et al.* (2000). Fue posible observar anastomosis así como ramificaciones simples y fue la única de las tres especies probadas que formó rizomorfos *in vitro*. Adheridas a las hifas se observaron abundantes gotas de exudados de color marrón a marrón amarillento (pigmentos incrustados sobre la pared) similares a los observados por Nouhra y Becerra (2001), aunque en micelio resultante de la síntesis micorrícica con *Pinus elliottii* (Figura 3.4 (a, b, c y d)).

Suillus luteus L. Gray. Por el haz de las placas de *Suillus luteus* se observó micelio color pardo claro o blanco pardusco, abundante en forma aérea apretado de textura algodonosa al igual que Barros *et al.* (2006) en PDA, para estos autores el color del micelio varía cuando cambia el medio de cultivo a MNM (marrón blancuzco). El micelio no era postrado y apretado, cuyo crecimiento origina estrías radiales que parten del resto de la colonia y hacen que su superficie tenga un aspecto tortuoso, que posee múltiples manchones con micelio aéreo de color marrón claro a crema de textura algodonosa. En algunas cepas el tipo de micelio predominante es de textura algodonosa no postrado de color pardo claro a crema, para otras el crecimiento del micelio es principalmente denso y apretado, el margen de las colonias es de ligero a ligeramente lobulado, rara vez circular. Sobre el micelio se formaron gran cantidad de gúttulas cristalinas de color marrón claro a oscuro. Existieron hasta tres zonas concéntricas de crecimiento distinguibles por los cambios de coloración, pero de la misma textura (Figura 3.5 (a y b)). En general el micelio obtenido en el presente estudio resultó similar al obtenido por Sánchez *et al.* (2000) sólo con ligeras variaciones en el color, las tonalidades rosas que ellos describen, son poco apreciables en el presente estudio al igual que lo observado por Torres (1992) y Torres y Honrubia (1993a).

Por el envés el medio de cultivo cambió intensamente su coloración a marrón oscuro en toda la placa, igual de intenso al centro y en el margen. En cepas jóvenes el margen por el envés de

la colonia permanece color crema amarillento a forma de aureola que desaparece conforme el color se hace más intenso. Y al igual que Barros *et al.* (2006) en PDA y MNM el borde de la cepa es claro o casi transparente. Las cepas de *S. luteus* fueron las que más modificaron el color del medio de tal forma que ya no fue posible observar el plug de inoculación al centro de la colonia (Figura 3.5 (c y d)).

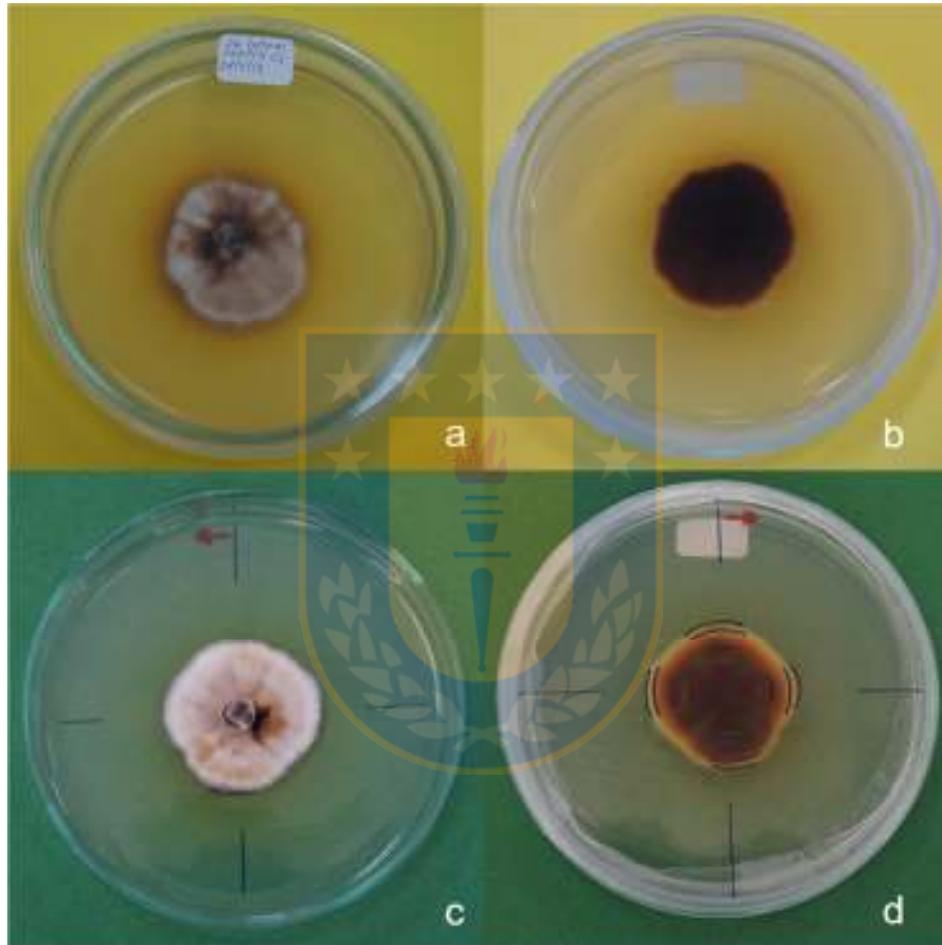


Figura 3.5 Haz y envés de placas Petri con cepas representativas con crecimiento micelial de *Suillus luteus* (Medio PDA, pH 5.8, $24\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, 30 días de crecimiento *in vitro*). Fuente: Elaboración propia.

Se observó crecimiento abundante de micelio sumergido altamente ramificado y crecimiento lobulado. En el envés de la placa no fue fácil distinguir zonas de crecimiento debido al obscurecimiento intenso del medio como lo observaron también Sánchez *et al.* (2000) y Barros *et al.* (2006); solo los márgenes de las colonias (zona de crecimiento activo) fueron de color más

claro, pero esto fue así sólo hasta que el crecimiento cesó, después la coloración del medio de cultivo se hace igualmente intensa en el envés de toda la colonia (Figura 3.6 (1 a 4)).

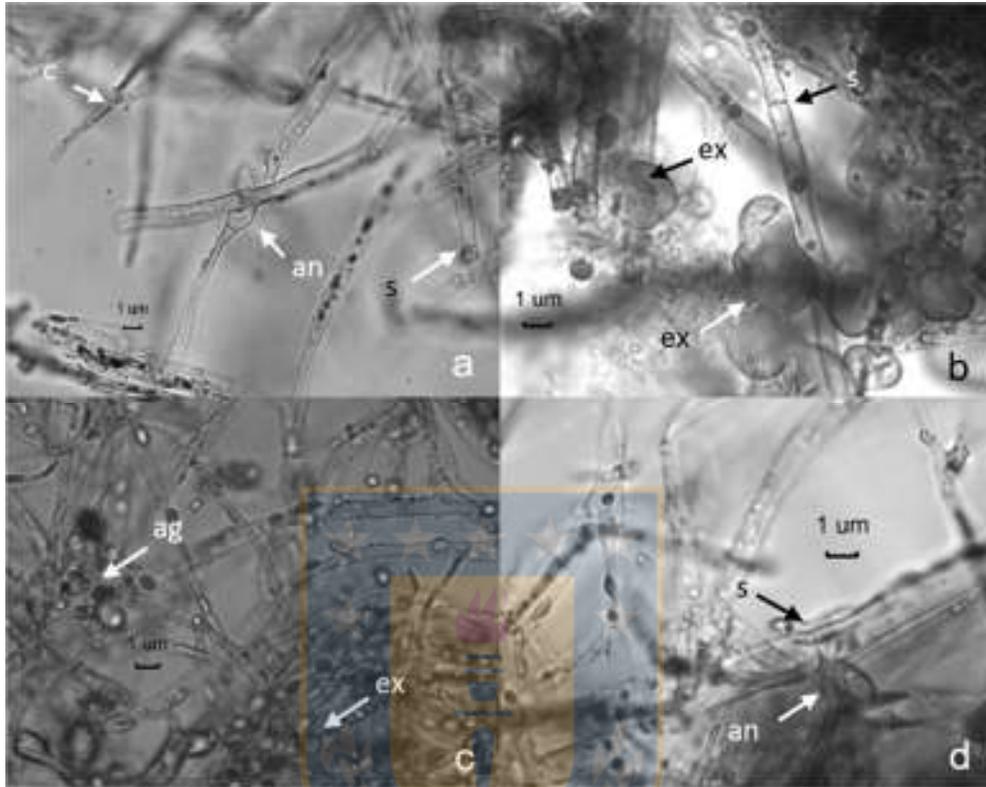


Figura 3.6 Estructuras del micelio de *Suillus luteus* (Medio PDA, pH 5.8, $24\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, 30 días de crecimiento in vitro, imágenes tomadas de preparaciones temporales contrastadas con Rojo Congo). Fuente: Elaboración propia.

Los cultivos miceliares de *S. luteus* produjeron hifas de paredes finas, algunas flexuosas, hialinas, filamentosas y tubulares, con abundantes ramificaciones simples, rara vez en perpendicular y muy entremezcladas. Se observó presencia de septos, estrangulamientos y engrosamientos intercalares, ubicados junto a los septos simples, que variaron de 1.0 a 11.0 μm en sus diámetros. Valores similares fueron encontrados por Sánchez *et al.* (2000), quienes en cepas de la misma especie observaron engrosamientos de hifas hasta de 12 μm de diámetro y a diferencia de Torres (1992) en este estudio se observó la presencia de fíbulas. Adheridas a las hifas se observaron también abundantes y grandes gotas de exudados amarillentos o marrón claro. Hifas con diámetros que variaron de 1.0 a 5.0 μm , también presentaron ensanchamientos y se observó presencia de anastomosis (Figura 3.6 (a y d)). Las características microscópicas de

los micelios obtenidos son similares a los obtenidos por Miller *et al.* (1983), aunque estos autores describen diferentes especies del mismo género como *S. granulatus* y *S. punctipes*. Estos resultados coinciden con los observados por Sánchez *et al.* (2000) en cuanto a las dimensiones de las diferentes estructuras, aunque ellos reportan colonias de tonalidades rosadas diferentes a las obtenidas en el presente trabajo y con las descritas por Torres y Honrubia (1993a).

Caracterización macro y microscópica de ectomicorrizas

La capacidad de colonización de un hongo es un criterio de selección para ser candidato en los programas de inoculación de viveros (Rincón *et al.* 1999). En el presente estudio todas las combinaciones hongo-pino presentaron abundantes estructuras ectomicorrícicas al momento de la evaluación (12 meses de cultivo). Los resultados del presente trabajo confirman la compatibilidad de las especies fúngicas y vegetales, algunas de las cuales suelen desarrollar simbiosis en sus áreas de distribución natural. Las especies fúngicas y de pino se asociaron mediante micorrización controlada (Pera y Parladé 2005), no fue posible encontrar información sobre la caracterización de las ectomicorrizas formadas por las especies de micobiontes y fitobiontes probadas en este estudio.

Rhizopogon luteolus + *Pinus canariensis*: En general, ápices ectomicorrícicos de tipo dicotómico simple con hifas extramatriciales entre las dicotomías, raramente simples no ramificados. En promedio las puntas de 1.0 mm y 5.0 mm de longitud total de las estructuras. De color blanco al inicio y cuando maduras color pardo claro a amarillento. De superficie lisa a ligeramente rugosa-fibrosa con hifas emergentes rectas, septadas y con presencia de fíbulas. Los rizomorfos surgen de la parte media y la punta de los ápices ectomicorrizados. El manto es en promedio de $34.47 \pm 2.3 \mu\text{m}$ de espesor de agregado celular plectenquimático de acuerdo con Agerer (2006). Por el contrario Fernández-Miranda (2007) para esta misma especie de HECM + *P. pinaster* determina un arreglo celular pseudoparenquimático en dos capas de espesor (6.35 ± 0.76 y $16.13 \pm 1.21 \mu\text{m}$ respectivamente). Con una capa de células en la interfase entre raíz y manto. La red de Hartig bien desarrollada extendida por todas las células corticales hasta llegar a la endodermis. Esta es la combinación hongo-pino que presentó el segundo menor valor promedio de grosor de manto, así como de diámetro medio de hifas $1.96 \pm 0.15 \mu\text{m}$, aunque las diferencias no fueron estadísticas, solo numéricas (Figura 3.7 (a, b, c y d)).

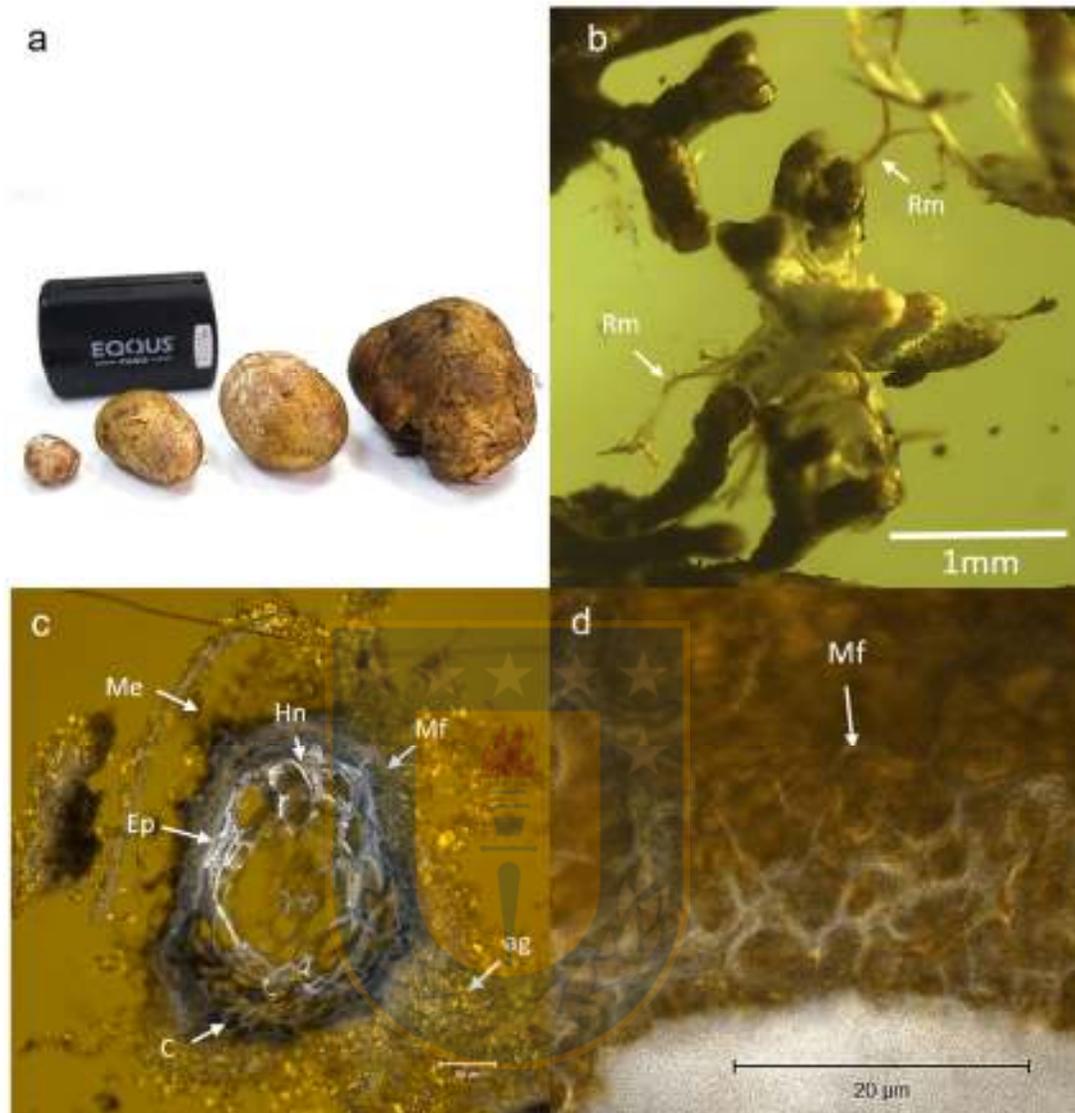


Figura 3.7 Caracterización de estructuras micorrícicas de *R. luteolus* + *P. canariensis*. (a) Esporocarpo; (b) ápice ectomicorrizado (12 meses de cultivo); (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imagen (b) tomada con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL)². Fuente: Elaboración propia.

² *Abreviaturas Figuras (3.7 – 3.14):* **ag**= agregados (partículas sólidas adheridas al micelio); **c**=células del cortex; **Ep**=epidermis de la raíz; **Hn**=red de Hartig; **Me**=micelio externo; **Mf**=manto fúngico (agregado celular) y **Rm**=rizomorfos.

Rhizopogon luteolus + *Pinus pinea*: Se presentan ápices ectomicorrícicos de tipo dicotómicas, pero en su mayoría de tipo coraloides, raramente simples no ramificadas. En promedio las puntas de 1mm y con longitud de hasta 1 - 4.5 mm en promedio total de la estructura. De color blanco al inicio y cuando maduras color pardo claro a amarillento. De superficie lanosa con hifas emergentes rizadas. Se observó gran cantidad de rizomorfos bien diferenciados y desarrollados que surgen de entre las dicotomías y la punta de los ápices ectomicorrizados (Figura 3.8 (a y b)). Como lo mencionan Rincón *et al.* (1999), esta característica podría ser de interés en la selección de hongos ectomicorrícicos para inocular plantas de *P. pinea*, que estén destinadas a ser establecidas y cultivadas en sitios con suelos de baja disponibilidad hídrica con climas de tipo mediterráneo. El promedio del grosor de manto fúngico es de $73.98 \pm 3.24 \mu\text{m}$ de espesor con agregado celular plectenquimático. Con sólo una capa de células en la interfase entre raíz y manto. La red de Hartig bien desarrollada extendida a través de todas las células corticales hasta llegar a la endodermis. Esta es la combinación hongo-pino que presentó el mayor valor promedio de grosor de manto promedio, así como de diámetro medio de hifas $2.65 \pm 0.18 \mu\text{m}$, aunque la diferencias no fueron estadísticas sólo numéricas. De acuerdo a los resultados el grosor del manto varía en función de la especie de pino en estudio, y también, en función de la especie de hongo. Por ejemplo Flores *et al.* (2005) encuentra que el grosor del manto fúngico de *Pinus ayacahuite* + *Lactarius indigo* presenta un grosor de 12- 42 μm (Figura 3.8 (c y d)).

En el presente estudio *Rhizopogon luteolus* + *Pinus pinea* fue la combinación de especies que formaron uno de los mantos fúngicos con mayor grosor. De acuerdo con Taylor y Alexander (2005) estas características del manto fúngico, junto con el porcentaje de colonización de ápices micorrizados o colonizados, significa que el huésped está efectivamente aislado del entorno (del suelo). Este aislamiento tiene implicaciones importantes sobre los nutrientes y el agua que ingresa a la raíz, pues estos deben pasar primero a través del manto, como cualquier material que sale de la raíz. Estos mismos autores mencionan que los hongos ectomicorrícicos (HECM) ocupan y, probablemente controlan, la interfaz entre el ambiente del suelo y la planta huésped. También aseveran que los mantos pueden controlar los flujos dentro y fuera de la raíz, el micelio que se extiende desde la superficie del manto (el micelio extraradical o extramatricial) se considera el sitio primario para absorción de nutrientes y agua (Figura 3.8 (c)).

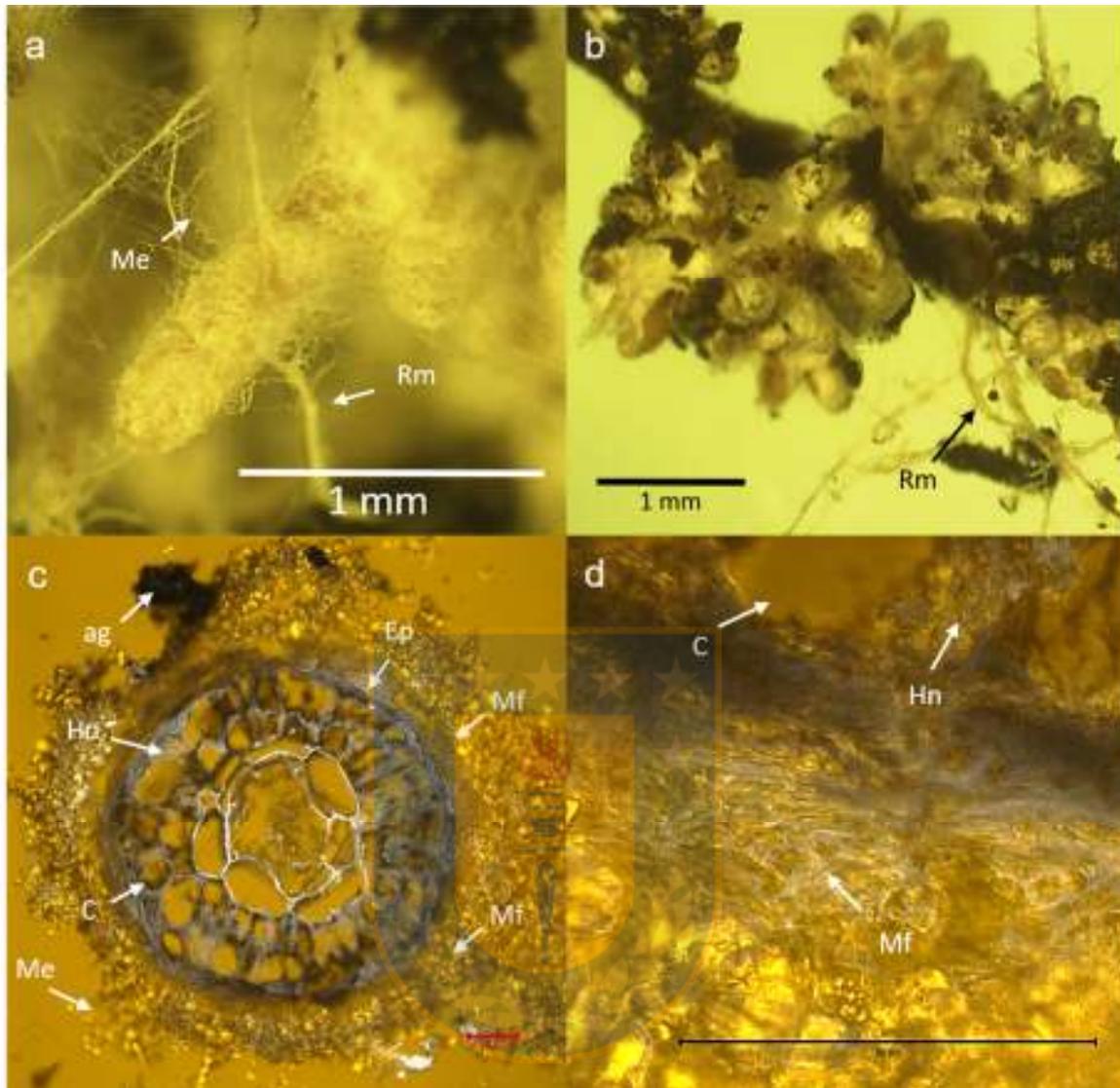


Figura 3.8 Caracterización de estructuras micorrícicas de *R. luteolus* + *P. pinea*. (a) ápice ectomicorrizado (12 meses de cultivo); (b) morfotipos tipo coraloide; (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imágenes (a y b) tomadas con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Rhizopogon luteolus + *Pinus pinaster*: El tipo de ramificación de las ectomicorrizas resultantes de esta combinación hongo-pino, en su mayoría son dicotómicas simples con hifas extramatriciales entre las dicotomías, raramente simples no ramificadas. En promedio con longitud de 1 - 5 mm de longitud. De color blanco al inicio y cuando maduras color pardo claro.

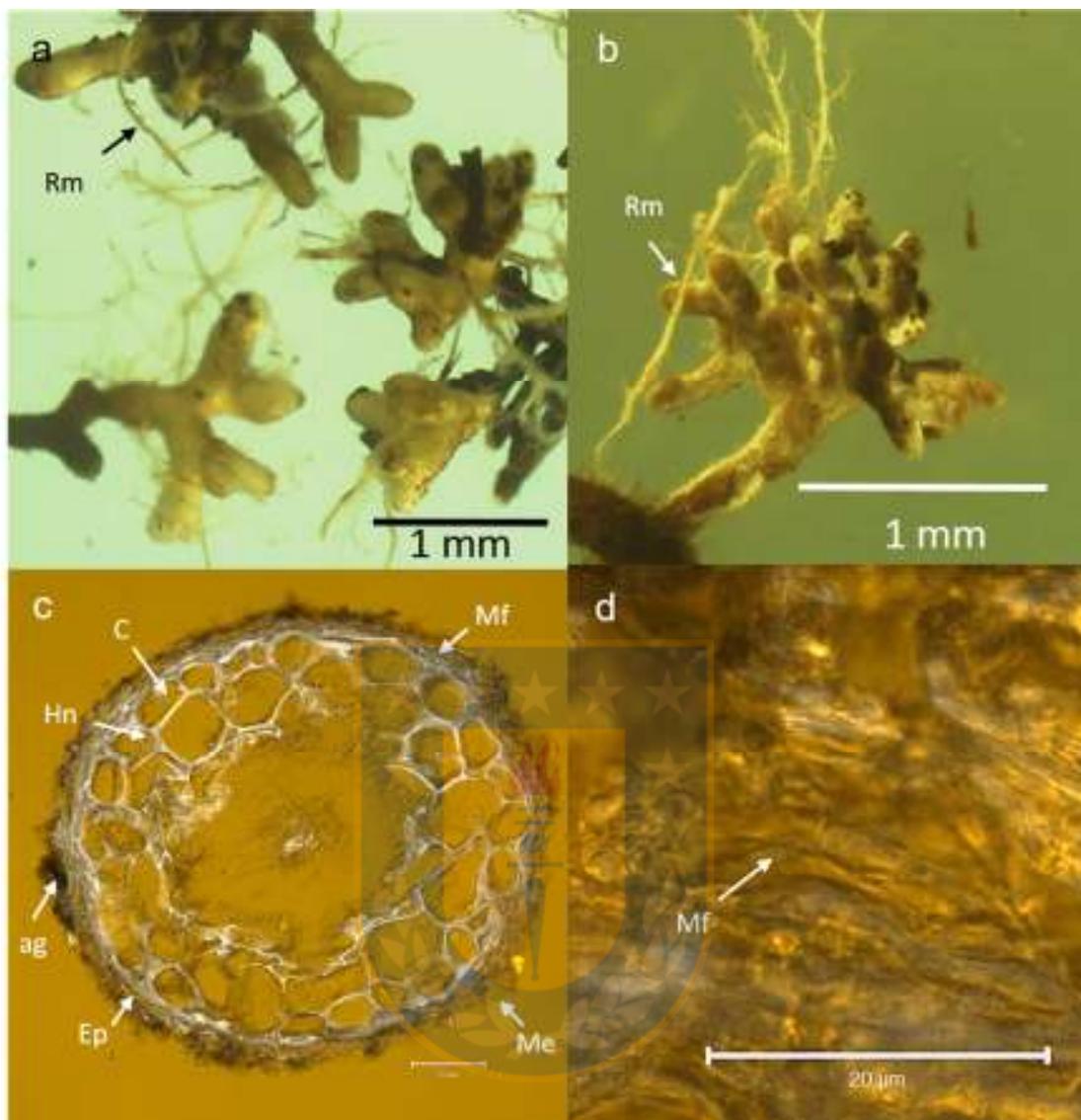


Figura 3.9 Caracterización de estructuras micorrícicas de *R. luteolus* + *P. pinaster*. (a y b) ápices ectomicorrizados (12 meses de cultivo); (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imágenes (a y b) tomadas con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Las características de las ectomicorrizas de *Rhizopogon luteolus* + *Pinus pinaster* en este estudio coinciden, con las del morfotipo descrito por Fernández-Miranda (2007) para esta misma combinación de micobionte-fitobionte. De forma similar a este morfotipo se observaron ectomicorrizas dicotómicas, con diferencias en la longitud del sistema (1.0 mm) y con las puntas

micorrizadas (0.7 mm). Con superficie lisa a ligeramente rugosa-fibrosa con hifas emergentes rectas, septadas y con presencia de fibulas. Abundantes rizomorfos que emanan de los ápices ectomicorrizados (Figura 3.9 (a y b)). El manto es en promedio de $16.41 \pm 0.79 \mu\text{m}$ de espesor con agregado celular de tipo plectenquimático de acuerdo con Agerer (2006), de forma contrastante Fernández-Miranda (2007) determina que el arreglo es pseudoparenquimático en dos capas diferentes. La primera de $6.35 \pm 0.76 \mu\text{m}$ y una segunda de $16.13 \pm 1.21 \mu\text{m}$ de espesor y para la misma combinación de hongo-pino probada en el presente estudio. En la interfase entre raíz y manto sólo una capa de células. Se observa una red de Hartig bien desarrollada y que en general se extiende por todas las células corticales hasta llegar a la endodermis, como lo reportado por Fernández-Miranda (2007). Esta es la combinación hongo-pino que presentó el menor grosor de manto promedio, y aunque sin diferencias estadísticas, también el menor diámetro promedio de hifas $1.5 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (Figura 3.9 (c y d)).

Rhizopogon luteolus + Pinus radiata: El tipo de ramificación de las ectomicorrizas resultantes de esta combinación hongo-pino, en su mayoría son dicotómicas. Con longitud total promedio por estructura de 1.0 - 5.5 mm y puntas de 1 mm de longitud. De color blanco al inicio y cuando maduras color pardo claro (Figura 10 (1 y 2)). De superficie lisa con hifas emergentes rectas y septadas. Abundantes rizomorfos conspicuos que emanan de entre las dicotomías y de la parte media de los ápices ectomicorrizados. Ortega *et al.* (2004), también observaron la presencia de abundantes y bien desarrollados rizomorfos en el sistema radical de plantas de *P. radiata* inoculadas con *R. roseolus*. Por su parte, Molina y Trappe (1994) mencionan que es una característica de *R. luteolus* el formar prolíficamente rizomorfos que crecen a través del suelo. El manto es en promedio de $55.68 \pm 2.49 \mu\text{m}$ de espesor de agregado celular pseudoparenquimático. En la interfase entre raíz y manto con solo una capa de células. Se observa una red de Hartig bien desarrollada y que en general se extiende por todas las células corticales hasta llegar a la endodermis. De forma similar, Molina y Trappe (1994) encontraron que *R. luteolus* forma una red de Hartig bien desarrollada que coloniza hasta la endodermis en raíces de plantas de *Pinus contorta*, *Pseudotsuga menziesii* y *Tsuga heterophylla*. Esta es la combinación hongo-pino que presentó el segundo mayor valor promedio de grosor de manto, que se corresponde con el promedio de diámetro de sus hifas $2.11 \pm 0.10 \mu\text{m}$ (Figura 3.10 (c y d)).

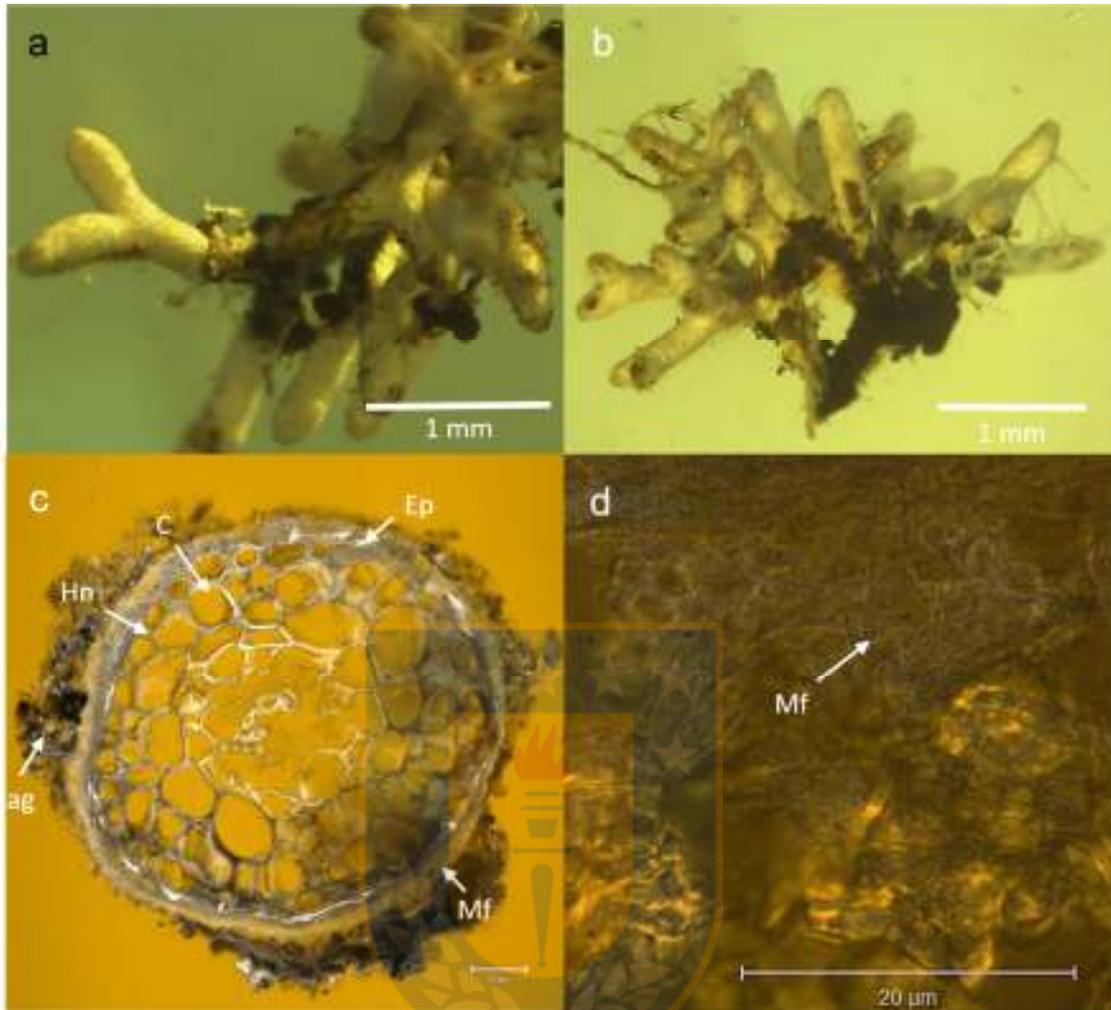


Figura 3.10 Caracterización de estructuras micorrícicas de *R. luteolus* + *P. radiata*. (a y b) ápices ectomicorrizados (12 meses de cultivo); (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imágenes (a y b) tomadas con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Suillus luteus + *Pinus canariensis*: Las ectomicorrizas observadas en esta combinación fueron dicotómicas simples o ramificadas, sésiles y estiradas. De color blanco en las primeras etapas de desarrollo, cambian a crema o marrón claro con la madurez. El manto de superficie lisa con abundantes hifas emanantes, la longitud de las micorrizas varía de 2-6 mm de largo, con ápices de hasta 1.5 mm de longitud (Figura 3.11 (b)). En general muy similares a las observadas por Torres y Honrubia (1993b) con *S. luteus* + *P. halepensis*.

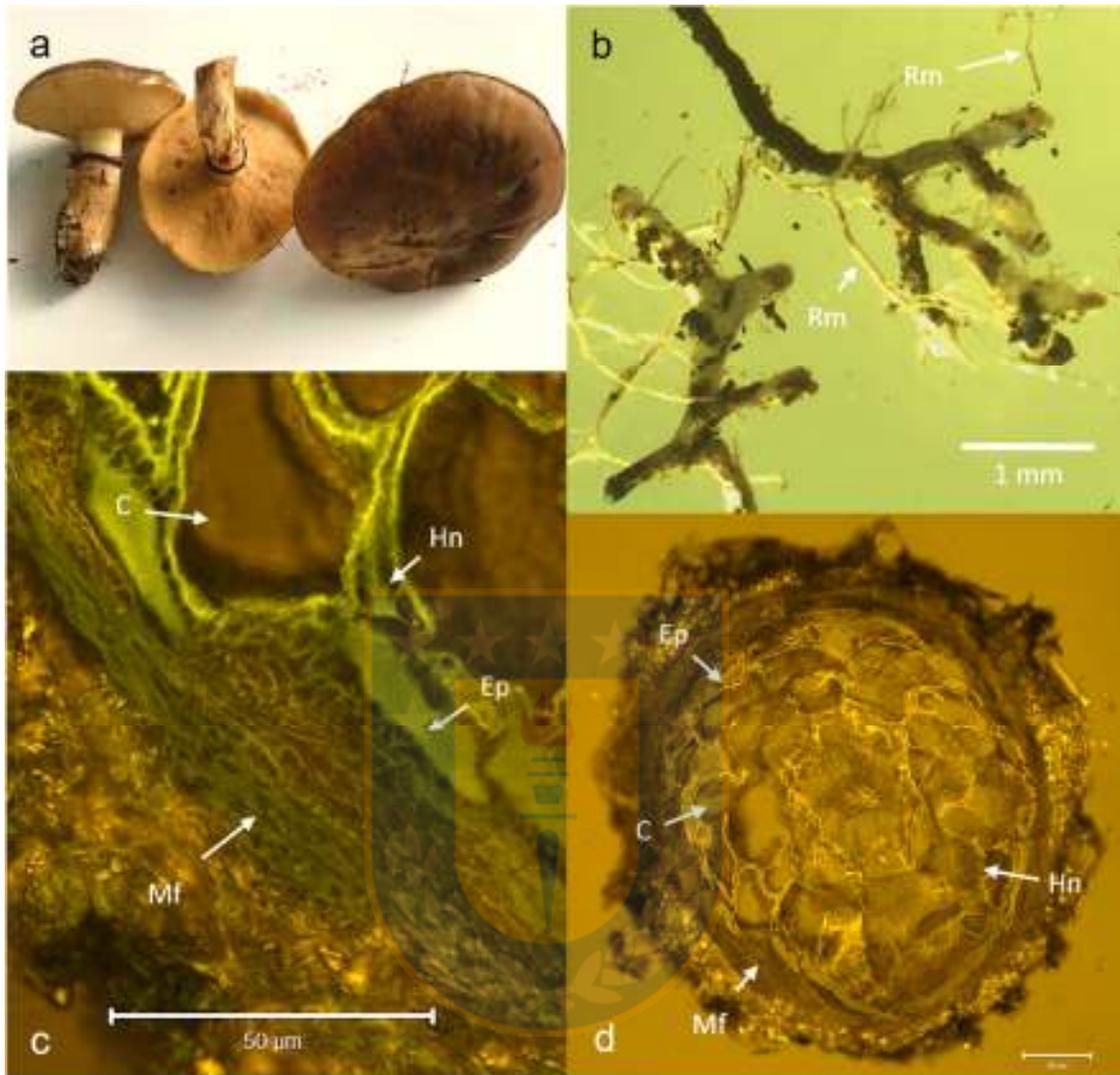


Figura 3.11 Caracterización de estructuras micorrícicas de *S. luteus* + *P. canariensis*. celular; (d) corte transversal de ápice ectomicorrizado. (Imagen (b) tomada con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c) y (d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Las especies del género *Suillus* suelen presentar diferencias en cuanto al tipo y dimensiones de las ectomicorrizas que forman con diferentes fitobiontes. Al respecto Jacobson y Miller Jr (1992) mencionan que las variaciones en la morfología de las micorrizas son más en función del árbol y no de la especie de hongo ectomicorrícico utilizado, aún cuando se trate una misma especie de hongo. Jacobson y Miller Jr (1992) observan que *S. granulatus* con *P. densiflora* y

P. strobilus forman micorrizas tipo coraloide con puntas dicotómicas, mientras que con *P. ryallichiana* forman micorrizas dicotómicas con similar longitud que las raicillas no micorrizadas. Gran cantidad de rizomorfos conspicuos (visibles a simple vista) que emanan de entre las dicotomías y de la parte media de los ápices ectomicorrizados. El manto es en promedio de 50.77 ± 1.73 μm de espesor, con agregado celular de estructura plectenquimatosa. En la interfase entre raíz y manto con sólo una capa de células. Se observa una red de Hartig bien desarrollada y que en general se extiende por todas las células del cortex hasta llegar a la endodermis al igual que para *S. luteus* + *P. halepensis* (Torres y Honrubia 1993b). El diámetro promedio de las hifas de esta combinación hongo-pino fue de 2.31 ± 0.14 μm no presentando diferencias estadísticamente significativas con las otras combinaciones (Figura 3.11 (c y d)).

Suillus luteus + *Pinus pinea*: Las ectomicorrizas observadas en esta combinación fueron dicotómicas simples o ramificadas, en su mayoría sésiles, rara vez estiradas de 0.5 - 2.0 mm de largo, con puntas cortas de 0.5 mm, aproximadamente. De color blanco en las primeras etapas de desarrollo, cambian a crema o marrón amarillento claro con la madurez. Con manto de apariencia lisa en su superficie con abundantes hifas rizadas. Los rizomorfos son abundantes visibles a simple vista emanando de en medio de las dicotomías y de la parte media de los ápices ectomicorrizados, con gran cantidad de micelio externo (Figura 3.12 (a y b)). Taylor y Alexander (2005) mencionan que *Suillus* spp. suelen desarrollar extensivos sistemas de micelio que pueden ocupar gran cantidad de volumen de suelo circundante. De acuerdo con Rincón *et al.* (1999) el que especies *Suillus* spp. formen gran cantidad de rizomorfos y micelio externo podría ser una característica deseable cuando se trate de la selección de HECM para *P. pinea*, que generalmente se cultiva bajo las condiciones secas asociadas a climas mediterráneos. El manto de estructura plectenquimatosa de acuerdo a la clasificación propuesta por Agerer (2006), el espesor promedio del manto fúngico es de 51.10 ± 2.08 μm . Con sólo una capa celular en la interfase entre raíz y manto. Se observa una red de Hartig bien desarrollada y que en general se extiende por todas las células del cortex hasta llegar a la endodermis. El diámetro promedio de las hifas de esta combinación hongo-pino fue de 1.85 ± 0.11 μm no se observaron diferencias estadísticamente significativas con las otras combinaciones. Pero a pesar de poseer un diámetro de hifas relativamente pequeño el grosor del manto fúngico que forma alrededor de los ápices de raíz es uno de los valores promedios más grandes en espesor (Figura 3.12 (c y d)).

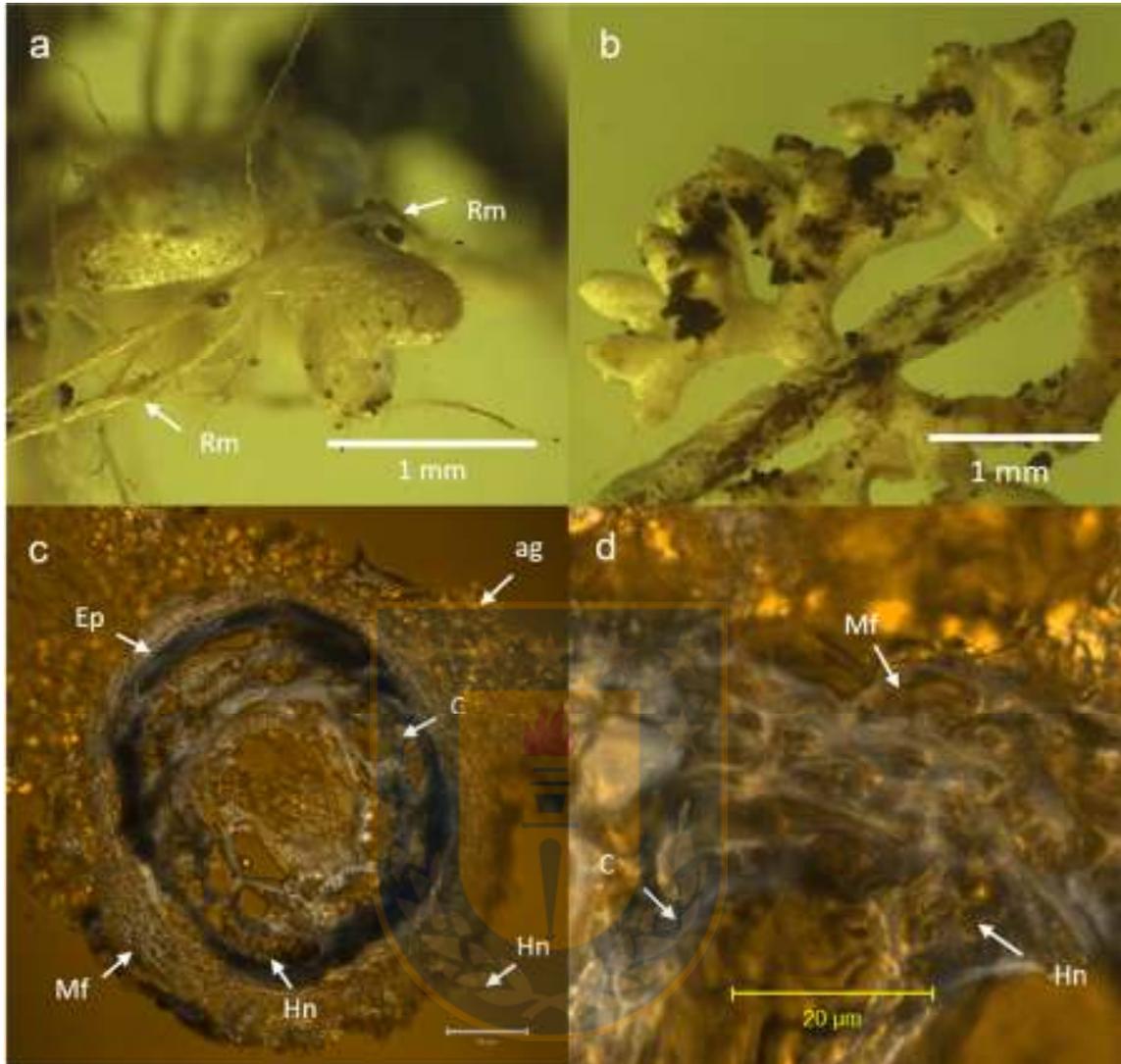


Figura 3.12 Caracterización de estructuras micorrícicas de *S. luteus* + *P. pinea*. (a y b) ápices ectomicorrizados (12 meses de cultivo); (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imagen (a y b) tomada con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Suillus luteus + *Pinus pinaster*: Se observaron ectomicorrizas dicotómicas simples o ramificadas, a veces sésiles pero en su mayoría con estípite de 1 - 6 mm de longitud, puntas en promedio de 1.0 mm. De color blanco en sus inicios y de color crema o marrón claro en la madurez, el manto de apariencia lisa mate en su superficie con gran cantidad de hifas

emergentes, coincidentemente por lo reportado por Fernández-Miranda (2007) para esta misma combinación de hongo-pino. A diferencia de esta autora las ectomicorrizas se encontraron distribuidas por todo el sistema radical del hospedero. En ocasiones se pueden apreciar gran cantidad de rizomorfos amarillentos, rizados conspicuos emanando de en medio de las dicotomías y de la parte media de los ápices ectomicorrizados, otras veces es tal la densidad que no es posible determinar su punto de origen, con gran cantidad de micelio externo. Rincón *et al.* (1999) mencionan que los géneros de hongos ectomicorrícicos *Rhizopogon*, *Scleroderma* y *Suillus* spp. se caracterizan por producir altas cantidades de rizomorfos (Figura 3.13 (a y b)). Los rizomorfos son órganos diferenciados (multi hifas) producidos por varios hongos basidiomicetos ectomicorrícicos y saprofitos, y algunos ascomicetes, durante el crecimiento a través del suelo. Proporcionan un medio efectivo de propagación de inóculo entre unidades de recursos de carbono (raíces finas en ectomicorrizas y trozos de lecho leñoso en saprofitos), a menudo interconectando muchas de esas unidades dentro de los sistemas rizomorfos individuales (Duddridge *et al.* 1980, Cairney 1992). Esta característica podría ser de interés en la selección de hongos ectomicorrícicos en programas de inoculación de plantas de interés forestal que generalmente se plantan en sitios bajo las condiciones secas asociadas con climas de tipo mediterráneo debido a que este tipo de estructuras se relacionan con la mejora de la absorción de agua por la planta (Rincón *et al.* 1999).

El manto de estructura plectenquimatosa de acuerdo a la clasificación de Agerer (2006), pero en contraste con Fernández-Miranda (2007) quien reporta dos capas de pseudoparenquima. El espesor promedio del manto fúngico es de $29.38 \pm 1.08 \mu\text{m}$ que sitúa a esta combinación hongo-pino en el tercer lugar de menor grosor promedio en grosor de manto. La interfase entre raíz y manto fúngico consta de una sola capa celular que forma una red de Hartig bien desarrollada y que suele extenderse a través de todas las células del cortex hasta la endodermis. El diámetro promedio de las hifas de esta combinación hongo-pino fue de $2.68 \pm 0.15 \mu\text{m}$ (promedio \pm error estándar) a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes combinaciones, esta combinación micobionte-fitobionte presentó uno de los mayores valores en cuanto al diámetro de hifas (Figura 3.13 (c y d)).

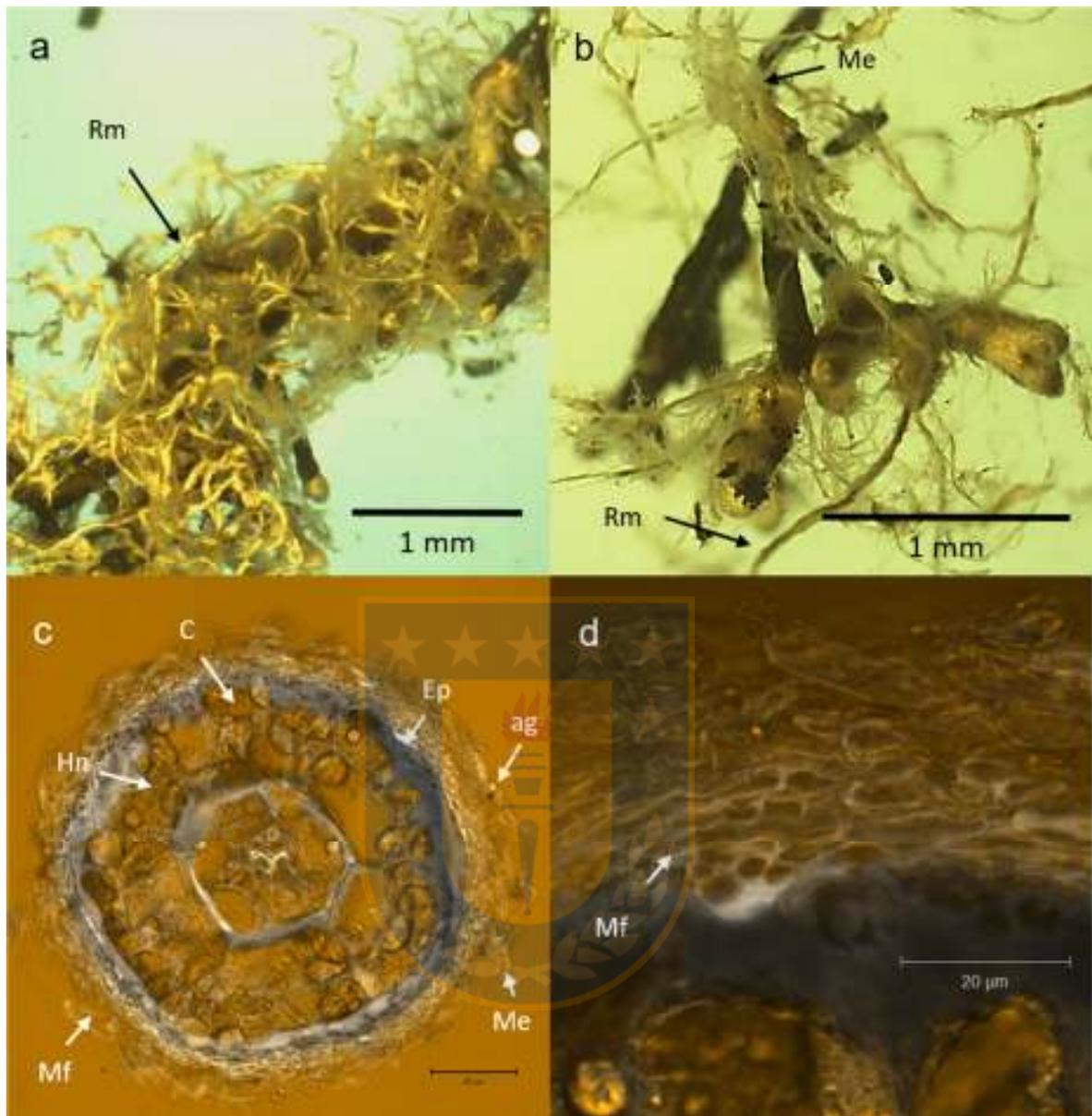


Figura 3.13 Caracterización de estructuras micorrícicas de *S. luteus* + *P. pinaster*. (a y b) Ápices ectomicorrizados y rizomorfos (12 meses de cultivo); (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imagen (a y b) tomada con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Suillus luteus + *Pinus radiata*: A pesar de que *P. radiata* es la especie con mayor superficie plantada en Chile, no existe registro de la caracterización de las micorrizas que forma con *S. luteus*, hongo micorrícico conocido como callampa de pino y que fructifica de forma

abundante en plantaciones adultas de *P. radiata*. Palm y Stewart (1984) mencionan varios registros de la inoculación de *P. radiata* con *S. luteus*, pero en ninguno de los trabajos se hace la caracterización de las estructuras micorrícicas resultantes. Es probable que este sea el primer trabajo relacionado con la caracterización de las ectomicorrizas de *Suillus luteus* + *Pinus radiata*.

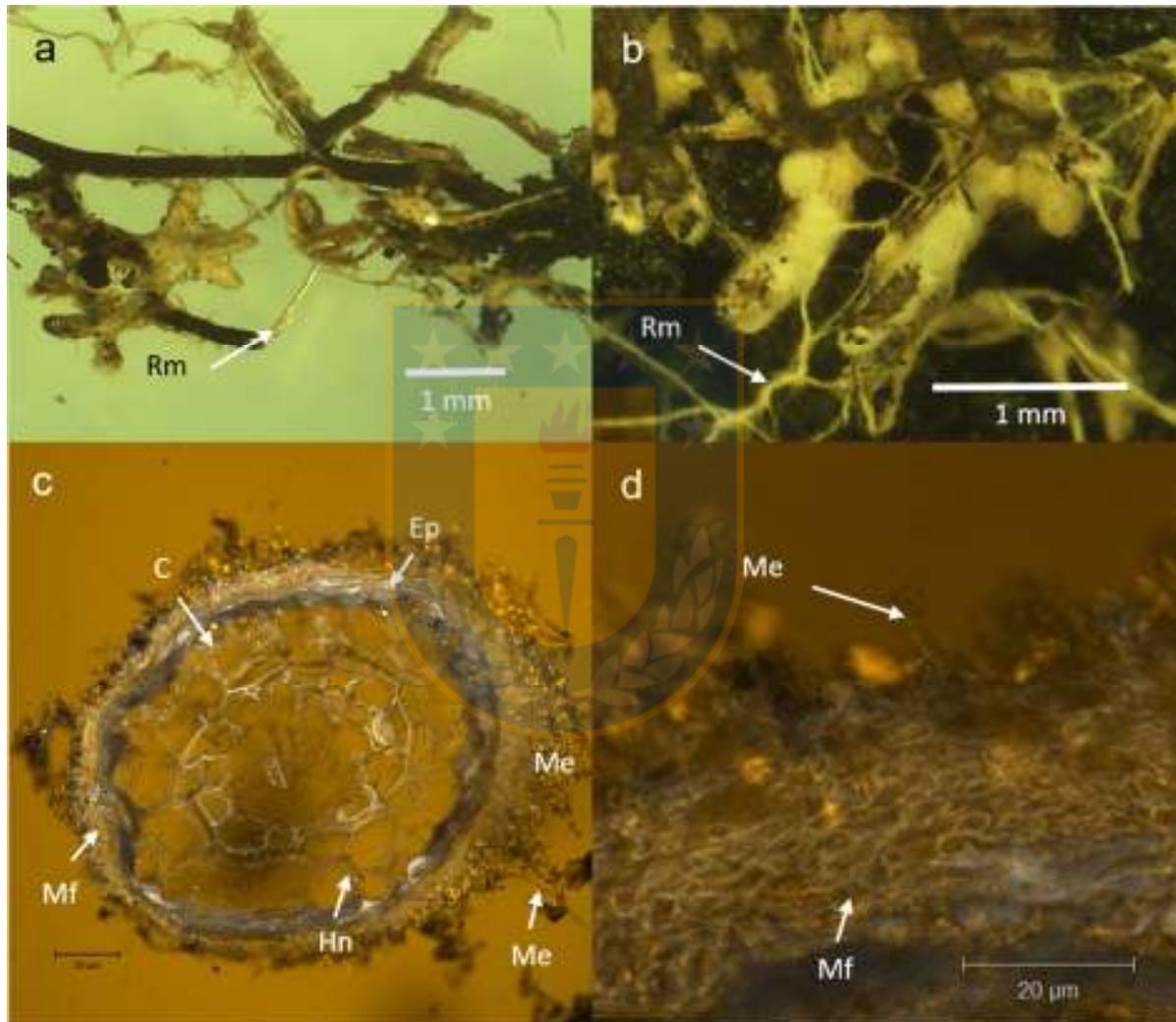


Figura 3.14 Caracterización de estructuras micorrícicas de *S. luteus* + *P. radiata*. (a y b) Ápices ectomicorrizados y rizomorfos (12 meses de cultivo); (c) corte transversal de ápice ectomicorrizado; (d) detalle del agregado celular. (Imagen (a y b) tomada con cámara acoplada a lupa estereoscópica; imágenes (c y d) tomadas, procesadas y contrastadas en microscopía CONFOCAL). Fuente: Elaboración propia.

Se observaron ectomicorrizas dicotómicas simples o ramificadas, a veces sésiles pero en su mayoría con estípites de 1 - 6 mm de longitud, puntas en promedio de 1.0 mm. De color blanco en sus inicios y de color crema o marrón claro en la madurez, el manto de apariencia lisa en su superficie con gran cantidad de hifas emergentes. Se pueden observar cantidades moderadas de rizomorfos amarillentos, conspicuos de aspecto afelpado emanando de en medio de las dicotomías y de la parte media de los ápices ectomicorrizados, con gran cantidad de micelio externo (Figura 3.14 (a y b)). El manto de estructura plectenquimatosa acorde con la clasificación de Agerer (1991), el espesor promedio del manto fúngico es de $29.38 \pm 1.08 \mu\text{m}$. Es la tercera combinación con el menor grosor promedio de manto fúngico. La interfase entre raíz y manto fúngico consta de una sola capa celular que forma una red de Hartig bien desarrollada y que suele extenderse a través de todas las células del cortex hasta la endodermis (Figura 3.14 (c y d)).

El diámetro promedio de las hifas de esta combinación hongo-pino fue de $2.68 \pm 0.15 \mu\text{m}$ a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes combinaciones, esta combinación micobionte-fitobionte presentó uno de los mayores valores en cuanto al diámetro de hifas. En general las características morfoanatómicas de las ectomicorrizas de *S. luteus* + *P. radiata* resultantes en el presente trabajo, presentan características similares con las reportadas por Torres y Honrubia (1993a) para la caracterización de las ectomicorrizas formadas por *S. luteus* + *P. halepensis*. Una de las más importantes diferencias con los resultados de estos autores es que no se observa penetración de las hifas en las células corticales.

No se presentan otras mediciones relacionadas al grosor de red Hartig debido a la dificultad de la cuantificación del número de capas celulares, especialmente en raíces de *P. canariensis* en las cuales el proceso de fijación parece haber afectado de forma importante la consistencia del tejido, y por consiguiente, la imposibilidad de obtener cortes limpios. Se realizó un análisis de varianza el cual mostró la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto al grosor promedio del manto fúngico (μm) entre las diferentes combinaciones de hongo-pino (Figura 3.15 (a)). No existiendo diferencias significativas en cuanto al diámetro de hifas (μm) (Figura 3.15 (b)). La combinación con el menor valor promedio de manto fúngico fue *R. luteolus*

+ *P. pinaster* ($16.41 \pm 0.79 \mu\text{m}$), seguido de *S. luteus* + *P. pinaster* ($29.38 \pm 1.08 \mu\text{m}$) y después por *R. luteolus* + *P. canariensis* ($34.47 \pm 2.27 \mu\text{m}$). Consistentemente la combinación *R. luteolus* + *P. pinaster* presentó el menor valor promedio de diámetro de hifas ($1.50 \pm 0.08 \mu\text{m}$), seguido de *S. luteus* + *P. pinea* ($1.85 \pm 0.11 \mu\text{m}$) y nuevamente *R. luteolus* + *P. canariensis* ($1.96 \pm 0.15 \mu\text{m}$). Los resultados sugieren que existen diferencias entre las diferentes combinaciones aún dentro de la misma especie de hongo dependiendo del hospedero del que se trate (Figura 3.15 (a y b)).

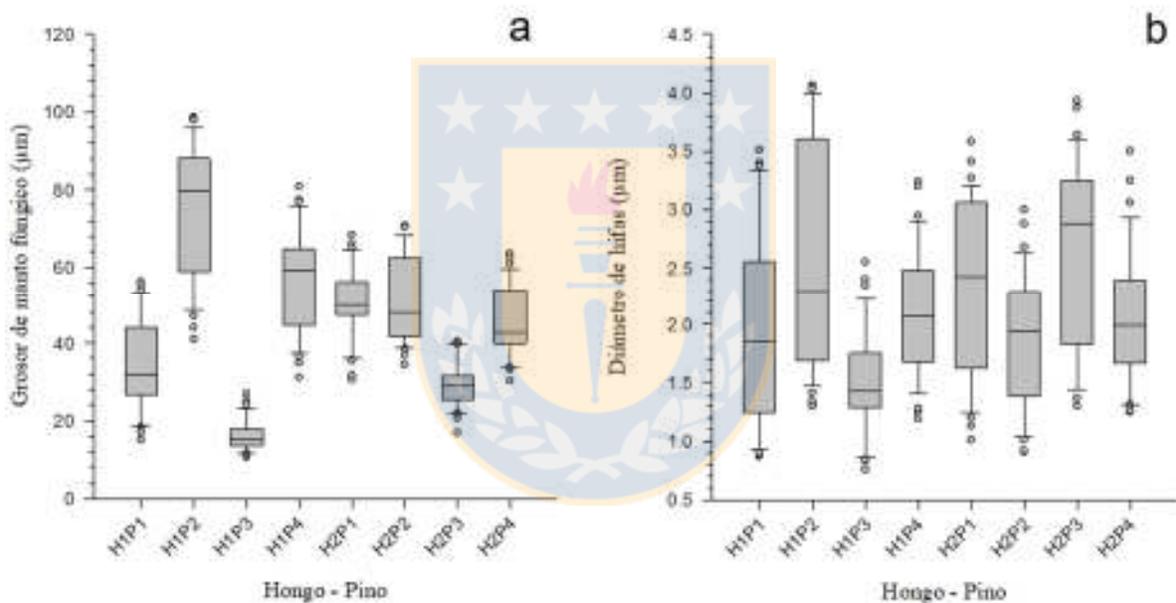


Figura 3.15 Grosor de manto fúngico (a) y diámetro de hifas (b) de las micorrizas resultantes de la combinación de los HECM *Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus* con las raíces de plantas de *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. radiata* a los 12 meses de cultivo en condiciones controladas. Imágenes a partir de cortes histológicos transversales de ápices ectomicorrizados mediante microscopia CONFOCAL, procesados y analizados con el software ZEN Black ® 2012. Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

Los resultados muestran que la compatibilidad y la eficacia de las esporas de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* para micorrizar en suspensión son una fuente de inóculo eficaz, de fácil aplicación y relativo bajo costo para la micorrización controlada de plantas de *Pinus canariensis* Chr. Smith ex. DC, *P. pinea* L., *P. pinaster* Ait, y *P. radiata* D. Don.

Los aislamientos en cultivo puro a partir de trozos de la parte interna de los carpóforos de los hongos ectomicorrícicos de *Rhizopogon luteolus* Fr., y *Suillus luteus* L. Gray. *S. granulatus* recolectados en plantaciones forestales de *P. radiata* D. Don son relativamente de fácil obtención. En el caso del *R. luteolus* de la zona central de la gleba y para las especies de *Suillus* sp. de fragmentos de tejido no expuestos al exterior, en la zona situada entre el himenio y la cutícula del píleo.

Las descripciones de ECM que se basan exclusivamente en material sintetizado *in vitro* o en condiciones controladas son válidas hasta cierto límite, debido a que las condiciones de crecimiento artificial a menudo no proporcionan todas las características que ocurren en la naturaleza. Sin embargo, el manejo apropiado de las relaciones suelo-planta-microorganismos es un enfoque, que a pesar de no ser reciente, sigue siendo promisorio para el manejo biotecnológico a fin de lograr sistemas agrícolas y forestales estables y productivos a largo plazo.

Existen variaciones en las estructuras ectomicorrícicas en función de las combinaciones hongo-pino, aún si se trata de la misma especie fúngica. La caracterización de las ectomicorrizas formadas por diferentes combinaciones hongo-planta permite conocer las características morfoanatómicas generales que permiten identificar los micobiontes involucrados aun cuando se carezca de carpóforos.

Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias de México (INIFAP, CORECADE NC13/83), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT 172007), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (CONICYT 2115253), por Beca de Doctorado a JL García-Rodríguez.

Referencias

- Addison SL, K Walbert, SJ Smaill, A Menkis. 2017. Edaphic properties related with changes in diversity and composition of fungal communities associated with *Pinus radiata*. *Pedobiologia*:1-26.
- Agerer R. 1991. 2 Characterization of Ectomycorrhiza. In: Norris JR, D Read, A Varma eds. Methods in microbiology. Volumen 23 Técnicas for the Study of Mycorrhiza. San Diego, CA. Academic Press. p. 25-73.
- Agerer R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* 5:67-107.
- Albert F. 1909. Los siete árboles forestales más recomendables para el país. In Algunas observaciones sobre las especies en la sección de aguas y bosques. Santiago, Chile. Ed. Cervantes. p. 52.
- Ardón-López CE. 2007. La producción de los hongos comestibles. Tesis Maestría. Guatemala. Departamento de Postgrado, Facultad de Humanidades, Universidad de San Carlos de Guatemala. p.
- Arévalo JR, A Naranjo-Cigala, MS Pascual. 2005. Regeneration in a mixed stand of native *Pinus canariensis* and introduced *Pinus pinea* species. *Acta Oecologica* 28:87-94.
- Atala C, E Muñoz-Capponi, G Pereira, E Navarrete, R Oses, M Molina-Montenegro. 2012. Impact of mycorrhizae and irrigation in the survival of seedlings of *Pinus radiata* D. Don subject to drought. *Gayana. Botánica* 69:296.

- Awada T, K Radoglou, MN Fotelli, HI Constantinidou. 2003. Ecophysiology of seedlings of three Mediterranean pine species in contrasting light regimes. *Tree physiology* 23:33-41.
- Barea J, C Calvet, V Estaun, A Camprubi. 1996. Biological control as a key component in sustainable agriculture. *Plant and Soil* 185:171-172.
- Barros L, P Baptista, IC Ferreira. 2006. Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotecnologica* 18:165-170.
- Boutheina A, MH El Aouni, P Balandier. Year. Influence of stand and tree attributes and silviculture on cone and seed productions in forests of *Pinus pinea* L. in northern Tunisia. In Mediterranean Stone Pine for Agroforestry, Zaragoza: CIHEAM /FAO/ INIA/ IRTA/ CESEFOR / CTFC. 9-14 p.
- Boyle CD, KE Hellenbrand. 1991. Assessment of the effect of mycorrhizal fungi on drought tolerance of conifer seedlings. *Canadian Journal of Botany* 69:1764-1771.
- Brownlee C, J Duddridge, A Malibari, D Read. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. In: Atkinson D, KKS Bhat, MP Coutts, PA Mason, DJ Read eds. *Tree Root Systems and Their Mycorrhizas*. Developments in Plant and Soil Sciences. Dordrecht. Springer. p. 433-443.
- Bryan W, B Zak. 1961. Synthetic culture of mycorrhizae of southern pines. *Forest Science* 7:123-129.
- Cairney JWG. 1992. Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. *Mycological Research* 96:135-141.
- Calonge FD. 2009. Guía de bolsillo para el buscador de setas. Madrid, España. Mundi-Prensa Libros.
- Castellano MA. 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. In *Concepts in mycorrhizal research*. Springer. p. 223-301.
- Castrillón M, JD León, D Carvajal, NW Osorio. 2015. Effectiveness of single and combined ectomycorrhizal inocula on three species of *Pinus* at nursery. *Communications in soil science and plant analysis* 46:169-179.

- Chapela IH, LJ Osher, TR Horton, MR Henn. 2001. Ectomycorrhizal fungi introduced with exotic pine plantations induce soil carbon depletion. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1733-1740.
- Chávez D, G Pereira, Á Machuca. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30:4-9.
- Chávez D, G Pereira, Á Machuca. 2014. Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *Bosque* 35:57-63.
- Díaz G, R Flores, M Honrubia. 2009. Descripción de cultivos miceliares de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista mexicana de micología* 30:1-7.
- Domínguez-Romero. D, H Vázquez R., BG Reyes R., JI Arzaluz R., AR Campos R. 2013. Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 16:51-59.
- Dubos C, G Le Provost, D Pot, F Salin, C Lalane, D Madur, J-M Frigerio, C Plomion. 2003. Identification and characterization of water-stress-responsive genes in hydroponically grown maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. *Tree physiology* 23:169-179.
- Dubos C, C Plomion. 2003. Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Molecular Biology* 51:249-262.
- Duddridge J, A Malibari, D Read. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834.
- Duñabeitia MK, S Hormilla, JI Garcia-Plazaola, K Txarterina, U Arteche, JM Becerril. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11-18.
- Ekwebelam S. 1977. Isolation of mycorrhizal fungi from roots of Caribbean pine. *Transactions of the British Mycological Society* 68:201-205.
- El Karkouri K, F Martin, JE Douzery, D Mousain. 2005. Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised *Pinus* seedlings in nursery conditions. *Microbiological research* 160:47-52.

- Eveno E, C Collada, MA Guevara, V Léger, A Soto, L Díaz, P Léger, SC González-Martínez, MT Cervera, C Plomion. 2007. Contrasting patterns of selection at *Pinus pinaster* Ait. drought stress candidate genes as revealed by genetic differentiation analyses. *Molecular Biology and Evolution* 25:417-437.
- Fabian-Veliz VU. 2012. Potencialidad del *Suillus luteus* (L. Fries) Gray con fines comerciales en plantaciones de *Pinus radiata* D. Don en Jauja. Tesis Perú. Facultad de Ciencias Forestales y del Ambiente, Universidad Nacional del Centro del Perú. p.
- Fernandes P, H Botelho. 2004. Analysis of the prescribed burning practice in the pine forest of northwestern Portugal. *Journal of Environmental Management* 70:15-26.
- Fernández-Miranda E. 2007. Influencia de las condiciones culturales en el crecimiento y capacidad inoculativa de diferentes especies de hongos ectomicorrícicos. Tesis Licenciatura en Biología. Oviedo, España. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo. 30 p.
- Flores R, G Díaz, M Honrubia. 2005. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza* 15:563-570.
- Flores R, M Honrubia, G Díaz. 2008. Caracterización de cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*. *Revista mexicana de micología* 26:51-55.
- Frioni L. 1999. Estrategias nutritivas y bionérgicas en los microorganismos. Efecto del ambiente. In: Frioni L ed. Procesos Microbianos. Argentina. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. p. 2-14.
- Galindo-Flores G, C Castillo-Guevara, A Campos-López, C Lara. 2015. Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences* 93:855-863.
- Gerhardt E, J Vila, X Llimona, MJ Fortes. 2000. Handbuch pilze. Hongos de España y de Europa: manual de identificación. Barcelona, España. Omega.
- Gieger T, C Leuschner. 2004. Altitudinal change in needle water relations of *Pinus canariensis* and possible evidence of a drought-induced alpine timberline on Mt. Teide, Tenerife. *Flora* 199:100-109.
- Guerra J, J Gayoso, J Schlatter, R Nespolo. 2005. Análisis de la biomasa de raíces en diferentes tipos de bosques. Avances en la evaluación de *Pinus radiata* en Chile. *Bosque* 26:5-21.

- Guerrero PC, RO Bustamante. 2007. Can native tree species regenerate in *Pinus radiata* plantations in Chile?: evidence from field and laboratory experiments. *Forest Ecology and Management* 253:97-102.
- HacsKaylo E. 1953. Pure culture syntheses of pine mycorrhizae in Terra-Lite. *Mycologia* 45:971-975.
- Hutchison L. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42:387-504.
- Jacobson KM, OK Miller Jr. 1992. Physiological variation between tree-associated populations of *Suillus granulatus* as determined by in vitro mycorrhizal synthesis experiments. *Canadian Journal of Botany* 70:26-31.
- Kumar S, T Satyanarayana. 2002. Isolation of Ectomycorrhizal Fungi : Methods and Techniques. In: Mukerji KG, C Manoharachary, BP Chamola eds. Techniques in Mycorrhizal Studies. Dordrecht. Springer Netherlands. p. 133-142.
- Lamb R, B Richards. 1970. Some mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* and *P. elliottii* var. *elliottii* in Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 54:371-378.
- Lavery PB, DJ Mead. 1998. *Pinus radiata*: a narrow endemic from North America takes on the world. In: Richardson D ed. Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge. Cambridge University Press. p. 432-449.
- Lazarevic J, N Keca, A Martinovic. 2012. Mycorrhization of containerized *Pinus nigra* seedlings with *Suillus granulatus* under open field conditions. *Forest Systems* 21:498-507.
- Lazo W. 2016. Hongos de Chile. Atlas micológico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 223 p.
- Le Tacon F, I Alvarez, D Bouchard, B Henrion, R Jackson, S Luff, J Parlade, J Pera, E Stenström, N Villeneuve. 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In: Read D, D Lewis, A Fitter, I Alexander eds. Mycorrhizas in ecosystems. UK. CAB International. p. 119-134.
- Lewis NB, IS Ferguson, W Sutton, D Donald, H Lisboa. 1993. Management of radiata pine. Melbourne, Australia. Inkata Press.
- Loewe M, R Delard. 2012. Un nuevo cultivo para Chile, el pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Instituto Forestal.

- Loewe MV, CD Rodríguez, M Balzarini, AÁ Contreras, RM Navarro-Cerrillo. 2015. Impact of climate and management variables on stone pine (*Pinus pinea* L.) growing in Chile. *Agricultural and Forest Meteorology* 214:106-116.
- Loewe V, C Delard, M González, S Mutke, V Fuentes. 2012. Introducción del pino piñonero (*Pinus pinea* L.) en Chile. *Ciencia e Investigación Forestal* 12:39-52.
- Loewe V, R Navarro-Cerrillo, RS Lucas, FR Gómez, J Jorrín-Novó. 2018. Variability studies of allochthonous stone pine (*Pinus pinea* L.) plantations in Chile through nut protein profiling. *Journal of proteomics* 175:95-104.
- Martínez DB, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque (Valdivia)* 28:226-233.
- Melin E. 1921. Über die mykorrhizenpilze von *Pinus silvestris* L. und *Picea abies* (L.) karst. *Sven Bot Tidskr* 15:192-203.
- Melin E. 1936. Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. *Handb Biol Arbeitsmeth* 11:4.
- Miller O, SL Miller, JG Palmer. 1983. Description and identification of selected mycorrhizal fungi in pure culture. *Mycotaxon* 18:457-481.
- Molina R, JM Trappe. 1994. Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon* I: host associations, host-specificity and pure culture syntheses. *New Phytologist* 126:653-675.
- Murrieta-Hernández DM, JC Noa-Carrazana, M Mata-Rosas, MdR Pineda-López, R Zulueta-Rodríguez, N Flores-Estévez. 2014. Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Pk.) Kuntze. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 20:101-107.
- Mutke RS, LD Balteiro, JG Alonso. 2000. Análisis comparativo de la rentabilidad comercial privada de plantaciones de *Pinus pinea* L. en tierras agrarias de la provincia de Valladolid. *Investigaciones Agrarias: Serie Recursos y Sistemas Forestales* 9:270-303.
- Mutke RS, S González-Martínez, A Soto, J Gordo, L Gil. 2008. El pino piñonero, un pino atípico. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* 24:81-85.
- Nergiz C, I Dönmez. 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry* 86:365-368.

- Norkrans B. 1949. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. *Svensk botanisk tidskrift* 43:485-490.
- Nouhra ER, AG Becerra. 2001. Síntesis micorrícica de *Suillus granulatus* (Eumycota) y plantines de *Pinus elliottii* (Pinaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 36:209-215.
- Oliveira RS, AR Franco, PM Castro. 2012. Combined use of *Pinus pinaster* plus and inoculation with selected ectomycorrhizal fungi as an ecotechnology to improve plant performance. *Ecological engineering* 43:95-103.
- Ortega U, M Dunabeitia, S Menendez, C Gonzalez-Murua, J Majada. 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.
- Palm ME, EL Stewart. 1984. In vitro synthesis of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus*+ *Suillus* combinations. *Mycologia* 76:579-600.
- Pera J, J Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* 14:419-433.
- Perdiguero P, C Collada, M del Carmen Barbero, GG Casado, MT Cervera, Á Soto. 2012. Identification of water stress genes in *Pinus pinaster* Ait. by controlled progressive stress and suppression-subtractive hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry* 50:44-53.
- Perdiguero P, M del Carmen Barbero, MT Cervera, C Collada. 2013. Molecular response to water stress in two contrasting Mediterranean pines (*Pinus pinaster* and *Pinus pinea*). *Plant Physiology and Biochemistry* 67:199-208.
- Pereira G, J Herrera, A Machuca, M Sánchez. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28:215-219.
- Rentería-Chávez MC, J Pérez-Moreno, VM Cetina-Alcalá, R Ferrera-Cerrato, B Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista argentina de microbiología* 49:93-104.

- Rincón A, IF Alvarez, J Pera. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-271.
- Rincón A, IF Álvarez, J Pera. 1999. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northeastern Spain. *Mycorrhiza* 8:271-276.
- Salas M. 1994. Estudio del área potencial y Serie de los pinares grancanarios (Islas Canarias-España). Tesis La Laguna. Universidad de La Laguna. p.
- Sánchez-Gómez D, F Cano, MT Cervera, I Aranda. Year. Variabilidad fenotípica en respuesta al estrés hídrico en una especie forestal genéticamente homogénea: *Pinus pinea* L. In 5º Congreso Forestal Español. Montes y sociedad: Saber qué hacer. 3-7 p.
- Sánchez F, M Honrubia, P Torres. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:127-134.
- Sánchez F, M Honrubia, P Torres. 2001. Effects of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie* 22:243-258.
- Sarrionandia E, I Olariaga, R Picón, M Duñabeitia, A Robredo, N Rodríguez, I Salcedo. 2015. Implications of exotic *Pinus radiata* plantations for macrofungal diversity in the Urdaibai Biosphere Reserve (northern Spain). *Canadian Journal of Forest Research* 45:667-675.
- Sousa NR, MA Ramos, AP Marques, PM Castro. 2012. The effect of ectomycorrhizal fungi forming symbiosis with *Pinus pinaster* seedlings exposed to cadmium. *Science of The Total Environment* 414:63-67.
- Stenström E, M Ek. 1990. Field growth of *Pinus sylvestris* following nursery inoculation with mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research* 20:914-918.
- Sutton WR. 1999. The need for planted forests and the example of radiata pine. *New Forests* 17:95-109.
- Taylor AF, I Alexander. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-112.
- Toro J, SP Gessel. 1999. Radiata pine plantations in Chile. *New Forests* 18:33-44.
- Torres MP. 1992. Estudio de las ectomicorrizas de pino carrasco (*Pinus halepensis* Miller). Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. Murcia, España. Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Murcia, Facultad de Biología. 165 p.

- Torres P, M Honrubia. 1993a. Descripción de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 18:163-170.
- Torres P, M Honrubia. 1993b. Ectomicorrizas de *Pinus halepensis* Miller. In Actas Congreso Forestal Español. Ponencias y comunicaciones. Tomo III, Lourinzán. 421-426 p.
- Varela L, D Trejo. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoologica Mexicana*:39-51.



CAPÍTULO IV

***IN VITRO* GROWTH OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH *Pinus radiata* PLANTATIONS IN CHILE³**

Summary

A comparative study of *in vitro* growth of three species of ectomycorrhizal fungi (ECMF) (*Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* and *Suillus luteus*) was performed. Fungal material was collected in adult *Pinus radiata* plantations. Isolation and purification of the strains was performed on potato-dextrose-agar medium and the evaluation of the radial growth rate and the increase in mycelial biomass, under different culture conditions, was performed on the Modified Melin Norkrans growth medium. The effects of temperature (24, 28 and 32°C) and pH (4.8, 5.3, 5.8, 6.3 and 6.8) of the growth medium were tested for the three fungal species in two independent assays. The results indicate that the temperature had a significant effect on the radial growth rate (RG) and mycelial biomass increase (MB) in all of the evaluated fungal species. The highest RGR and MBI were recorded in *R. luteolus*, and the lowest values for these variables were registered in *S. luteus*. *Rhizopogon luteolus* had the highest sensitivity to pH changes. Meanwhile, there was no pattern in *S. granulatus* and *S. luteus* growth response under different pH conditions. When cultivated *in vitro*, the three studied species of ECMF presented adaptation, exponential, declining and stationary growth phases. The *in vitro* growth responses recorded in the present study showed the great potential of *R. luteolus* to be used in future programs using mycorrhizal inoculation in the production of *Pinus radiata* trees in nurseries in Chile.

Index words: *Rhizopogon*, *Suillus*, biomass, pure culture, radial growth rate.

³ García-Rodríguez J-L, J Pérez-Moreno, D Ríos-Leal, P Saez-Delgado, C Atala-Bianchi, M Sánchez-Olate, G Pereira-Cancino. 2017. *In vitro* GROWTH OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH *Pinus radiata* PLANTATIONS IN CHILE. *Revista fitotecnia mexicana* 40:415-423.

CRECIMIENTO *in vitro* DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS ASOCIADOS CON PLANTACIONES DE *Pinus radiata* EN CHILE⁴

Resumen

Se hizo un estudio comparativo del crecimiento *in vitro* de tres especies de hongos ectomicorrícicos (ECMF) (*Rhizopogon luteolus*, *Suillus granulatus* y *Suillus luteus*). El aislamiento y purificación de las cepas se hizo en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), y la evaluación de la velocidad de crecimiento radial (RG) y del incremento en biomasa micelial (MB), bajo diferentes condiciones de cultivo, se hizo en el medio de crecimiento Melin Norkrans Modificado (MMN). Los efectos de la temperatura (24, 28 y 32 °C) y pH (4,8, 5,3, 5,8, 6,3 y 6,8) del medio de crecimiento fueron probados para las tres especies fúngicas en dos ensayos independientes. Los resultados indican que la temperatura tuvo un efecto significativo en la tasa de crecimiento radial (RG) y en el incremento de biomasa micelial (MB), en todas las especies fúngicas evaluadas. Los más altos valores de GR y MB fueron registrados en *R. luteolus*, y los valores más bajos fueron registrados en *S. luteus*. *Rhizopogon luteolus* presentó la mayor sensibilidad a los cambios de pH del medio de cultivo. En cambio, no existió un patrón en la respuesta de crecimiento de *S. granulatus* y *S. luteus* bajo diferentes condiciones de pH. Cuando se cultivaron *in vitro*, las tres especies de ECMF estudiadas presentaron en su crecimiento micelial las fases de adaptación, crecimiento exponencial, declinación y estacionaria. Las respuestas de crecimiento *in vitro* registradas en el presente estudio mostraron el gran potencial de *R. luteolus* para ser utilizado en futuros programas de micorrización controlada para la producción en vivero de árboles de *Pinus radiata* en Chile.

Palabras clave: *Rhizopogon*, *Suillus*, biomasa, cultivo puro, tasa de crecimiento radial.

⁴ García-Rodríguez J-L, J Pérez-Moreno, D Ríos-Leal, P Saez-Delgado, C Atala-Bianchi, M Sánchez-Olate, G Pereira-Cancino. 2017. *In vitro* GROWTH OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH *Pinus radiata* PLANTATIONS IN CHILE. *Revista fitotecnia mexicana* 40:415-423.

Introduction

Around 95% of higher plants naturally establish mutualistic symbiotic relationships with mycorrhizal fungi whose external mycelium can explore up to 1000 times more soil than the roots (Brundrett *et al.*, 1996; Honrubia *et al.*, 1992). This symbiosis therefore improves the nutrition of the associated plants by mobilizing nutrients and water (Honrubia *et al.*, 1992; Quoreshi, 2008; Skinner and Bowen, 1974). Quality of plants successfully mycorrhized by ectomycorrhizal fungi (ECMF) is improved in terms of vigor, drought tolerance, increased in nutrient uptake and resistance to post-transplant stress in the field (Bücking *et al.*, 2012; Dulmer *et al.*, 2014). The inoculation with ECMF is a recommended practice to produce plants of high quality in nurseries (Díaz *et al.*, 2009). The selection of the appropriate ectomycorrhizal fungal species as symbionts and their subsequent manipulation, both in the laboratory and in the nursery, can be a key factor for the successful establishment of many tree species in the field (Chávez *et al.*, 2007; Honrubia *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 1994). One criteria of great relevance in the selection of the ECMF is the use of species which are growing naturally associated with the selected plants in the sites of interest (Honrubia *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2007). Different types of mycorrhizae have been described depending on the structures that they form, although in general, in the case of tree species with importance in forestry in temperate climates, the ectomycorrhiza is the most important type of mycorrhizae (Harley and Smith, 1983; Marks and Kozłowski, 1973; Smith and Read, 2008). The ECMF are an important component of microbial soil communities in boreal, temperate, mediterranean and some tropical forests where they play an important role in nutrient recycling processes (Allen *et al.*, 1995). The growth of ECMF depends in nature on factors such as temperature, pH, humidity, soil physical and chemical properties and nutrient availability, mainly carbon and nitrogen sources (Bowen, 1973; Harley and Smith, 1983). The ECMF are usually mesophilic; the temperature directly influences their growth because it affects the enzymatic production; and thus can cause the denaturation of proteins and other macromolecules of the cell membranes (Frioni, 1999). Additionally, the soil pH affects the microbial activity through the solubility and the ionization of the inorganic and organic compounds in the soil solution (Voroney, 2006). *In vitro* pure culture studies contribute to the study of the ECMF in order to understand their behavior in different cultivation conditions (Pirt, 1975). Growth differences of ECMF under *in vitro* conditions have been considered a

guide for prescreening potential fungal species (strains or ecotypes) to be used in nursery mycorrhization programs. In the present study, the production of biomass in different *in vitro* conditions was analyzed in order to understand the optimal temperature and pH conditions for the evaluated ECMF (Eng *et al.*, 2003; Lazarević *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2001). The objective of the present study was to analyze the effect of three temperatures and five different pH values on the *in vitro* growth of the species of ECMF *R. luteolus*, *S. granulatus* and *S. luteus* naturally associated with *Pinus radiata* plantations growing at low productivity sites in Chile, considering that each strain or ecotype has its own ecological optimal conditions.

Materials and methods

Fungal material. The ectomycorrhizal fungi (ECMF) *Rhizopogon luteolus* Fr., *Suillus granulatus* (L.) Roussel and *Suillus luteus* L. Gray were harvested in adult plantation of *Pinus radiata* D. Don growing on a representative site of a large forest area with sandy soils with low productivity (pH 5.6; organic matter: 2.39%; N:1.3%; P:6.7%; K:47.9%) in the province of Biobío, Region VIII, Chile (37 ° 20'42 .58 "S, 72 ° 17'55 .15" W) during June to September 2015 (Figure 1A, B, C). The species identification was performed by using a macro- and micro-morphological characterization of their sporomes (Calonge, 2009; Gerhardt *et al.*, 2000; Honrubia *et al.*, 2010; Lazo, 2016). In laboratory, under aseptic conditions in a laminar flow cabinet (ESCO®, USA) the sporomes were dissected and small parts of the pilea context located immediately above the hymenium in epigeous mushrooms; and in the central area of the gleba in hypogeous fungi, were respectively extracted (Brundrett *et al.*, 1996; Honrubia *et al.*, 1995; Kumar y Satyanarayana, 2002). The tissue fragments were placed in 50 mm diameter Petri dishes with 10 mL of potato dextrose agar medium (HiMedia®, India) with pH adjusted to 5.8. For each species, five strains were collected from the collection site, and from them the strain with the best initial growth was studied in detail. The plates were incubated at 24±1°C (BINDER® incubator, Germany) until an active growth of the mycelia (stock cultures) was obtained. Later, agar-mycelial discs of 5 mm in diameter of the margin of the isolated strains (Díaz *et al.*, 2009), were transferred to new Petri plates with 20 mL of potato dextrose agar medium and pH adjusted to 5.8, in order to complete the processes of isolation and purification.

These plates were incubated at $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 18 days, obtaining pure strains of the three ECMF species of *R. luteolus*, *S. granulatus*, and *S. luteus* (Figura 4.1 A, B, C).

Experimental approach. Two independent experiments were set up. In the first experiment the effect of the temperature was evaluated. The three ECMF strains were cultivated at pH 5.8 and the effect of three different temperatures was evaluated. In the second experiment the effect of pH on mycelial growth was evaluated for the three isolated strains. The strains were cultivated at 24°C and the effect of five different pH values was evaluated.

Culture conditions tested. In the first experiment, the evaluated temperatures were 24, 28 and 32°C (Andrino *et al.*, 2011; Arana-Gabriel *et al.*, 2014; Bran *et al.*, 2015; Lazarević *et al.*, 2016). From growing active colonies (stock cultures), 5 mm diameter agar-mycelial discs were transferred to 90 mm diameter Petri dishes containing 20 mL of agar Modified Melin Norkrans (MMN) as culture medium, with a pH adjusted to 5.8. This pH value was used because it has been previously employed in the cultivation of other ECMF. Five plates per species and three temperature values were set up (n=45). Cultures were grown in three separate incubators (Mettler®, Germany). In the second experiment, five different pH values were evaluated: 4.8, 5.3, 5.8, 6.3 and 6.8 (González *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2007; Sundari and Adholeya, 2003; Vásquez-García *et al.*, 2002). Prior to its sterilization, the pH adjustment of the culture medium was performed with a PH 21 Hanna Instruments electrode applying HCl to acidify the medium and KOH to basify it. In this experiment, 5 mm diameter agar-mycelial discs were transferred to 90 mm diameter Petri dishes containing 20 mL of agar MMN culture medium, with each tested pH. Five plates for each pH value were set up (n=75), which were incubated in darkness at $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ based on the fact that this was the optimal temperature in terms of fungal growth in the first experiment.

Growth traits. The average radial growth (RG) of the evaluated ECMF strains was recorded for each of the evaluated temperatures and pH values. The plates were incubated during 21 days and the radial growth of the colonies was measured every three days on the back of the plates (in four directions that passed through the center of the colonies) with a digital caliper (Mitutoyo, Mod. CD-6) (Murrieta-Hernández *et al.*, 2014).



Figura 4.1 Sporomes of the ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon luteolus* (A), *Suillus granulatus* (B), *S. luteus* (C); and *in vitro* mycelial growth at three temperatures (D, E and F) and five pH values (G, H and I) in Modified Melin Norkrans culture medium. Fuente: Elaboración propia.

The non-accumulated growth (NARG) was the average of the growth distance of four radial points for each measurement, to which the average growth of previous measurements was not added. These data were adjusted by a linear regression equation to calculate the slope of the growth curve corresponding to the average growth rate of each fungal species and expressed in mm day^{-1} (Santiago-Martínez *et al.*, 1995; Vázquez- García *et al.*, 2002).

After the culture period, the increase in mycelial biomass (MB) was evaluated for both experiments by recovering the biomass produced in Petri dishes with vacuum filtration (Filtering Pump K, model SU 660). The filtering of the growth medium previously melted in microwave was carried out by using filter paper, previously oven dried and weighed in an analytical balance (RADWAG®, USA). The mycelial mass retained on the filter paper was oven dried (Memmert, model BE-400) at 60°C during 48 hours in order to determine the constant dry weight (Duñabeitia *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2014).

Statistical analysis. In both experiments, completely randomly statistical designs with factorial arrangements, 3x3 in the first experiment and 3x5 in the second experiment, were respectively used. In the first experiment the factors were: ECMF species and culture temperatures, giving a total of 45 experimental units. Meanwhile, in the second experiment the factors were the ECMF species and the pH of the culture medium, giving a total of 75 experimental units. In order to determine the effect of the studied factors on the RGR and MB, the tests of homogeneity of variances and normality through the Shapiro-Wilk and Levene Test were previously performed. When the distributional assumptions were not verified, Box-Cox powers for data normalization (Olivier and Norberg, 2015) were applied. In both experiments a two-way analysis of variance was performed with a 95% confidence level and because the interaction was significant, contrasts were performed by LSD Fisher ($\alpha=0.05$) for the analysis of significant differences. Tukey ($P < 0.05$) mean comparison tests (Steel and Torrie, 1989) were carried out among treatments. Statistical analysis of the data was performed by using the statistical program STATGRAPHICS®.

Results

Experiment I (temperature)

Radial growth (RG). The results showed that the temperature had an effect on the RG for the three ECMF evaluated species, with a negative effect when this variable increased (Figure 1D, E and F, Figure 2A). The highest RG was obtained at 24°C and the lowest at 32°C, regardless of the ectomycorrhizal fungi (ECMF), having differences ($P < 0.05$) among species. It was

observed that *R. luteolus* and *S. luteus* had greater sensitivity to the temperature change, expressed in the differences between their treatments ($P < 0.05$). *Rhizopogon luteolus* had the highest RG in the three evaluated temperatures being 2.49, 1.81, 1.10 mm day⁻¹, respectively. These RG were different ($P < 0.05$) of those recorded for *S. luteus* and *S. granulatus* in the three evaluated temperatures. The last two species did not present differences ($P < 0.05$) in RG between them, independently of the tested temperatures.

Mycelial biomass (MB). The MB of the three evaluated ECMF was also affected by the tested temperatures (Figure 2B). The highest ($P < 0.05$) MB was registered at 24°C and the lowest at 32°C for all species. *Rhizopogon luteolus* showed the highest sensitivity, expressed as differences ($P < 0.05$) between each of the tested temperatures. *Suillus granulatus* and *S. luteus* only showed differences ($P < 0.05$) between extreme temperatures (24 and 32°C). *Rhizopogon luteolus* had the highest MB with 143.5, 101.8 and 60.7 mg, and *S. luteus* had the lowest MB with 28.5, 17.3 and 1.9 mg for the three evaluated temperatures, respectively. At the most extreme temperatures (28 and 32°C) there were greater MB differences ($P < 0.05$) in the three ECMF.

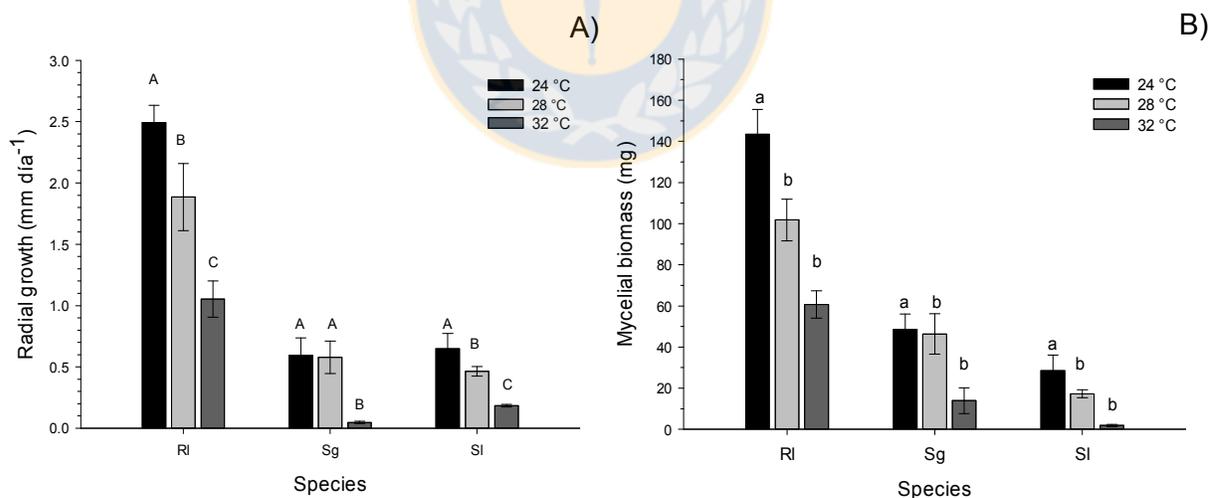


Figure 4.2 (A) Radial growth (mm day⁻¹) and (B) mycelial biomass (mg) of three fungal ectomycorrhizal species at three culture temperatures. Values are means± standard error of the mean (n=5). Bars with the same letter, for each species, are not different according to the Tukey test ($P < 0.05$). RI= *Rhizopogon luteolus*; Sg= *Suillus granulatus*; SI= *Suillus luteus*. Fuente : Elaboración propia.

Experiment II (pH)

Radial growth (RG). The pH had a different effect on the RG of the evaluated fungal species, and there was not a defined pattern (Figura 4.1 G, H, I and Figura 4.3 A). *Rhizopogon luteolus* reached its maximum ($P < 0.05$) RG at pH 4.8 (1.52 mm day⁻¹) and the lowest at pH 6.3 (1.00 mm day⁻¹), with significant differences between pH 4.8 compared to 5.8, 6.3 and 6.8. This species showed the highest RG in all of the evaluated pH values compared with the other two fungal species. In the case of *S. granulatus* and *S. luteus*, the RG only differed ($P < 0.05$) at pH 4.8, 5.3 and 6.8.

Mycelial biomass (MB). *Rhizopogon luteolus* showed only MB differences ($P < 0.05$) between the extreme pH treatments (4.8 and 6.8) (Figura 4.3 B). *Suillus granulatus* and *S. luteus* did not show a pattern in terms of MB when grown in the different evaluated pH values. The pH of 4.8 yielded a higher ($P < 0.05$) MB in *R. luteolus* (104.76 mg) compared to *S. granulatus* (63.26 mg) and *S. luteus* (64.74 mg).

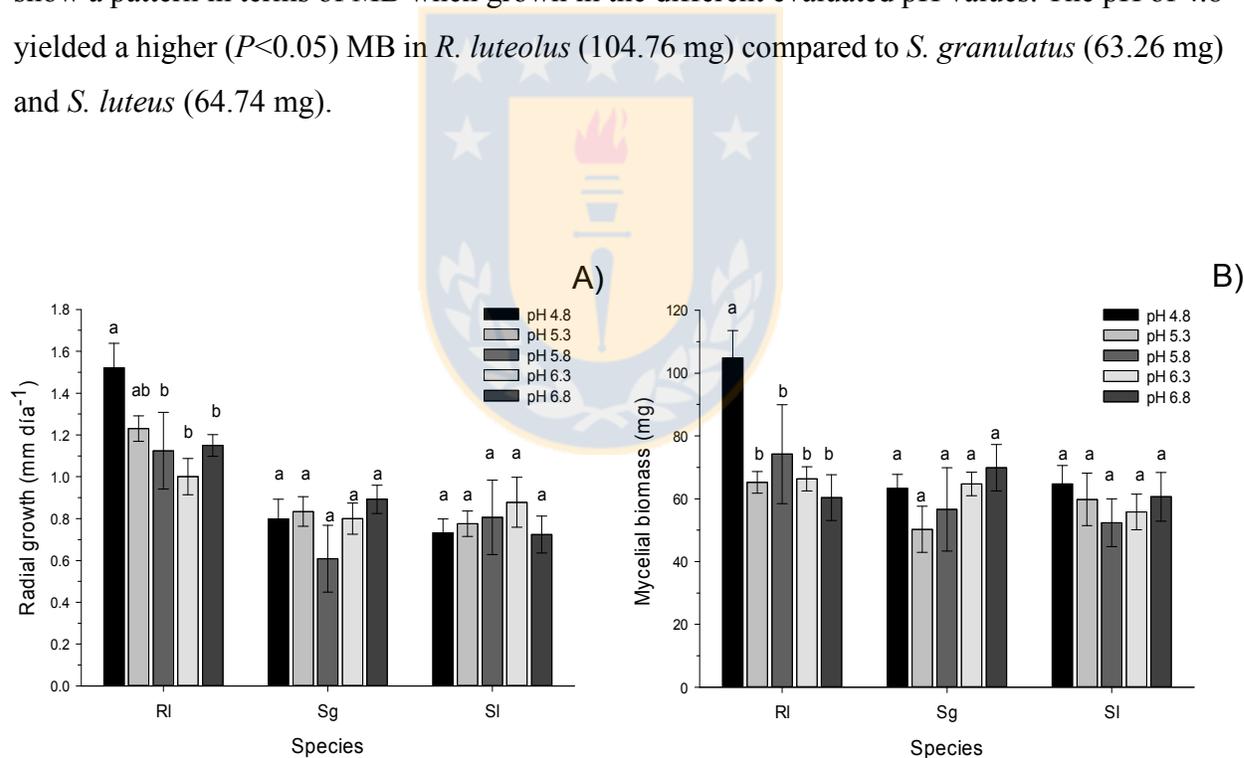


Figura 4.3 (A) Radial growth (mm day⁻¹) and (B) mycelial biomass (mg) of three fungal ectomycorrhizal species at five pH. Values are means± standard error of the mean (n=5). Bars with the same letter, for each species, are not different according to the Tukey test ($P < 0.05$). RI= *Rhizopogon luteolus*; Sg= *Suillus granulatus*; SI= *Suillus luteus*. Fuente : Elaboración propia.

Experiments I and II (temperature and pH)

Accumulated radial growth (ARG) and non-accumulated radial growth (NARG). The three evaluated ECMF showed the four cultivation growth phases: culture medium adaptation, exponential, declining and stationary phases. In general, this trend was observed in all of the evaluated temperatures and pH values (Figura 4.4 B and Figura 4.4 D). The adaptation phase was longer (approximately six days) in the experiment where the influence of temperature was evaluated compared with that of different pH values (approximately three days) (Figura 4.4 A and Figura 4.4 C). *Rhizopogon luteolus* showed the highest ARG in both the temperature and pH experiments (Figura 4.4 A and Figura 4.4 C).

In *R. luteolus*, the period of the exponential phase of NARG was dependent on the temperature. This phase concluded on day 12 at 24°C and on day 9 at both 28°C and 32°C (Figura 4.4 B). After this phase, the decline of NARG in *R. luteolus* continued until day 21, and then the stationary phase started. In the case of the experiment where different pH values were evaluated, in general the exponential phase of the NARG was shorter, finishing in between days 6 and 9 depending on the ECMF species. Then, the exponential period was recorded between days 15 and 18, and after that the declining phase began until day 24, to conclude with the stationary phase of NARG (Figura 4.4 D).

Discussion

The knowledge of the biological, physiological and symbiotic characteristics of ECMF, as well as the specificity that they have with certain hosts, are fundamental requirements in order to choose the most appropriate fungal species in the production of ectomycorrhizal tree seedlings. Environmental factors, including temperature and pH largely influence the formation and the development of mycorrhizal structures (Smith and Read, 2008). In general, most ECMF are considered to grow well at moderate temperatures between 11°C and 28°C (Hutchison, 1990). However, there are differences in the fungal growth among isolates of ECMF at different environmental temperatures (Dames *et al.*, 1999; Hutchinson, 1990). Some studies have shown that the ectomycorrhizal mycelium might be very sensitive to temperature variations (Lazarević

et al., 2016; Marx *et al.*, 1970; Sánchez *et al.*, 2001). If the soil dramatically cools, the metabolic activity of the fungi and the roots decrease, with negative consequences for mycelial growth and nutrient availability for both the fungi and the associated plants (Lazarević *et al.*, 2016). The results of the present study showed that the culture temperature had an effect on the *in vitro* growth of *R. luteolus*, *S. granulatus* and *S. luteus* species. The best growth, both in terms of RG and MB, was reached at 24°C for the three species of the evaluated ECMF, and when the temperature was increased to 28 and 32°C, a negative effect was observed.

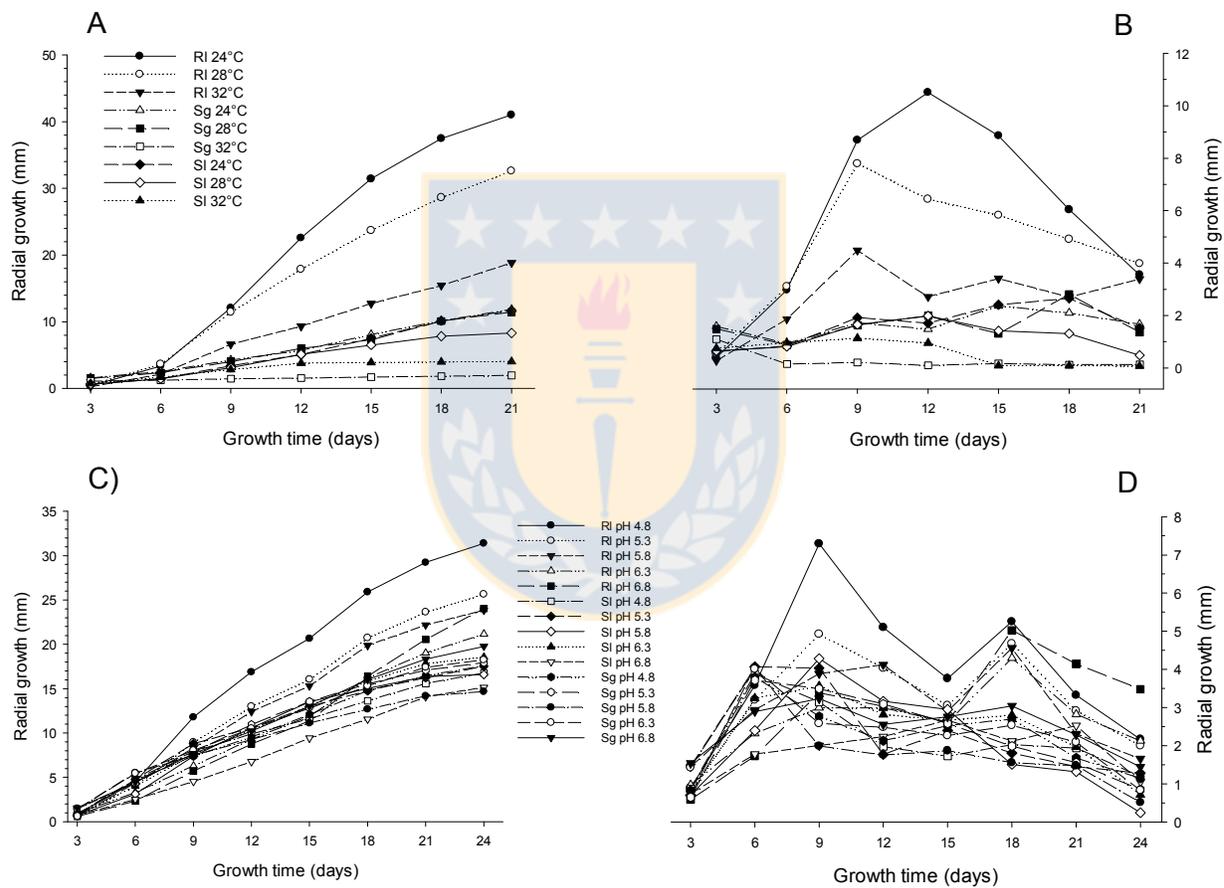


Figure 4.4 Average (A and C) accumulated and (B and D) non-accumulated radial growth of three fungal ectomycorrhizal species at three temperatures (at pH 5.8) under five pH values (at 24°C). Values are means (n=5). In order to have more clarity in the graphs the \pm error bars are not shown. Rl= *Rhizopogon luteolus*; Sg= *Suillus granulatus*; Sl= *Suillus luteus*. Fuente: Elaboración propia.

Different authors have reported similar findings to those that we found. Jha *et al.* (2006) reported optimal growth for *R. luteolus* in temperatures ranging from 20 to 25°C. Sánchez *et al.* (2001) recorded the highest growth values for *R. roseolus*, *Suillus collinitus*, *S. granulatus* and *S. luteus* at temperatures of 23°C. Similarly to our own findings, they registered significant decreases with increasing temperatures. Dennis (1985) reported optimal growth for *S. granulatus* at 25°C and for *S. luteus* in the interval of 20 to 25°C. Lazarević *et al.* (2016) recorded the best growth for *S. collinitus* and *S. granulatus* at 22°C. Cline *et al.* (1987) reported the best growth for *S. granulatus* at 27°C, and for *Suillus* spp. optimal mycelial growth between 16 and 32°C. In the present study, *R. luteolus* showed the best mycelial growth among the three studied ECMF species independently of the temperatures tested. Sánchez *et al.* (2001) found similar results for *Rhizopogon* and *Suillus* species. The maximum radial growth rate reached by *R. luteolus* (2.49 mm day⁻¹) in the present work was above those previously reported 1.15, 1.98 and 1.28 mm day⁻¹ by Chávez *et al.* (2007), Pereira *et al.* (2007) and Vásquez-García *et al.* (2002), respectively. However, the maximum values of RG obtained by *S. granulatus* and *S. luteus* in the present study are below those registered by Santelices *et al.* (2012) for *S. luteus*, under the same culture conditions.

The pH can biologically determine the type of organism that is able to develop on a soil or a substrate, due to its significant influence on the nutrient availability (Pereira *et al.*, 2007). The pH can strongly affect the microbial activity through nutrient availability, ionization of the constituents of the inorganic and organic soil solution, and therefore can have a paramount importance in the enzymatic activity of the soil (Voroney, 2007). In the present study, a different behavior of the evaluated ECMF species was recorded for the different pH values. *Rhizopogon luteolus* presented the greatest sensitivity of RG and MB to changes in pH, showing a decrease in these variables when the pH was increased. Jha *et al.* (2006) and Pereira *et al.* (2007) found similar trends for *R. luteolus*. Vásquez-García *et al.* (2002) reported optimal growth for *Rhizopogon* sp. in BAF medium at pH 6.0, significantly decreasing the growth when pH was either increased or decreased. Duñabeitia *et al.* (2004) did not find changes in terms of colony diameter and mycelial growth biomass of *R. luteolus* when the pH was modified.

In the present study, *S. granulatus* and *S. luteus* did not show a clear trend when the pH changed. Similar responses were found for *S. luteus* by Santelices *et al.* (2012) and for *S. bellinii* by Pereira *et al.* (2007). Murrieta-Hernández *et al.* (2014) and Vásquez-García *et al.* (2002), in their studies with several species of *Suillus* reported different behaviors in terms of growth when the pH of the culture medium was modified. In contrast, Dennis (1985) found significant differences in radial growth when *S. granulatus* and *S. luteus* were grown in ranges of pH from 3 to 6. Barros *et al.* (2006), González *et al.* (2014) and Pereira *et al.* (2007) recorded differences in terms of RG for *S. luteus* when the pH was modified. In the present work, *R. luteolus* showed the highest values of RG, pH 4.8 showing the highest value (152 mm day⁻¹) and pH 6.3 recording the lowest one (1.0 mm day⁻¹). The results showed that, in general, *R. luteolus* tends to grow better under acidic than alkaline conditions. This agrees with the trends mentioned by Hung and Trappe (1983), Lazarević *et al.* (2016) and Willenborg *et al.* (1990), who mentioned that ECMF have in general, an acidophilic nature when grown under pure culture conditions.

However, it is important to mention that there are some exceptions either specific or intraspecific, i.e. Sánchez *et al.* (2001) found that *S. granulatus*, *S. luteus* and *S. collinitus* had their best biomass increase responses at a pH of 8.5. *In vitro* mycelial growth of a fungus changes according to the culture medium used and the experimental culture conditions (Pereira *et al.*, 2014; Santelices *et al.*, 2012). The lack of significant trends obtained in the pH experiment could probably be explained because no biological buffers were added to growth media. Such buffers are essential to stabilize the pH variable. According to García-Rodríguez *et al.* (2006) and Hung and Trape (1983) during the development of *in vitro* mycelium, ECMF produce a series of organic acids, through the absorption of ions, acidifying the growth medium, and negatively affecting the growth and development of the fungi. Additionally, conventional culture media such as Modified Melin Norkrans have low buffering capacity and therefore the effects of pH on fungal growth in such media are difficult to evaluate (Child *et al.*, 1973, Hung and Trappe, 1983; Yamanaka, 2003).

Organic and inorganic acids, such as acetates, citrate, phthalate and phosphate, have been used as alternative buffers to stabilize pH. Guerin Laguette *et al.* (2000) showed the importance of biological buffers in pH experiments with fungal growth, they found very strong evidence of

the influence of pH on the *in vitro* mycelial development of two edible ectomycorrhizal mushrooms. The growth of *Lactarius deliciosus* and *L. sanguifluus* was optimal at 5.5-6.0 and 5.5-6.5, respectively. They used 5X agar medium to which the biological buffer MES (2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid) was added and the pH was adjusted with 4 M NaOH prior to autoclaving. Although some of these acids may inhibit the growth of fungi (Giltrap and Lewis, 1981, Hilger *et al.*, 1986, Inoue and Ichitani, 1990), MES and other buffers such as piperazine-N and N'-bis (2-ethanesulfonic acid) are considered to be physiologically inert (Good *et al.*, 1966). It has also been shown that these buffers can stimulate the growth of some ectomycorrhizal fungi (Yamanaka, 2003).

The fungi present a growth development that usually involves the adaptation, exponential, declining and stationary phases (Manero-Colín *et al.*, 2012; Sánchez and Royse, 2001). The three species of evaluated ECMF in the present work showed these four well-defined phases in our *in vitro* culture conditions. It was observed that the adaptation phase was more conspicuously marked in the first experiment where temperatures were evaluated, compared to the second experiment where the effect of pH conditions was studied. Santelices *et al.* (2012), reported only the adaptation, exponential and stationary phases for *S. luteus*. Coleman *et al.* (1989), reported the same growth pattern for *S. luteus* in Modified Melin Norkrans culture medium, with absence of the initial adaptation phase; however when water stress treatments were involved in their trials, the initial phase of adaptation became more conspicuous.

In the present experiment, the exponential phase of *R. luteolus* was strongly dependent on the culture temperature. When the pH of the medium varied, the period of the exponential phase was in general short, producing in some species a second period of exponential growth. In the kinetics study of the ECMF, the growth phases involved in their cultivation are fundamental to analyze and understand because they provide important information related to the particular growth dynamics of each ECMF species. These studies can show the exact moment when the mycelium of a particular fungus is physiologically active in culture and has the maximum potential to be used as an inoculum in possible programs of inoculum production in order to produce mycorrhizal plants. The understanding of the optimal *in vitro* conditions to grow native strains will allow the generation of ectomycorrhizal inoculum in enough quantities to be applied

to *P. radiata* tree production under greenhouse conditions. Such work has previously been carried out in other pine species such as *P. pinea* in Spain with *Rhizopogon* spp. (Rincon *et al.*, 2005). Afterwards, if there is successful and abundant ectomycorrhizal colonization the establishment of plantations with the local plant and the studied fungal genotypes might be favoured.

Conclusions

The results indicated that the mean radial growth rate and the biomass increase of strains of *R. luteolus*, *S. granulatus* and *S. luteus* were significantly affected by the increased temperature. The optimum cultivation temperature for all of the evaluated species was 24°C. There was a significant decrease with temperature increases.

Under the present culture conditions without biological buffers, the pH variability of the medium, in the range of 4.8 to 6.8, did not significantly affect the mycelial growth of *S. granulatus* and *S. luteus* species. However *R. luteolus* decreased its growth when pH was increased.

Among the three evaluated fungal species, *R. luteolus* showed the greatest mycelial production. Therefore, this species also shows the greatest potential for the large-scale production of mycelial inoculum at a larger scale, useful in the production of ectomycorrhizal *Pinus radiata* trees.

Acknowledgments

The support of the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research of Mexico (INIFAP, CORECADE NC13/83), of The Council National of Science and Technology of Mexico (CONACYT 172007), and of The Chilean National Council for Science and Technology (CONICYT 2115253) through a doctoral scholarship granted to J.L. García-Rodríguez is acknowledged. The authors also thank two anonymous referees and the Editor whose valuable comments helped to substantially improve the original manuscript.

References

- Allen E. B., M. F. Allen, D. J. Helm, J. M. Trappe, R. Molina and E. Rincon (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil*, 170:47-62, <http://dx.doi.org/10.1007/bf02183054>.
- Andrino A., M. A. Morte G. y M. Honrubia G. (2011) Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios. *Anales de Biología* 33:53-66, <http://dx.doi.org/10201/27369>.
- Arana-Gabriel Y., C. Burrola-Aguilar, R. Garibay-Orijel y S. Franco-Maass (2014) Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 20:213-226, <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.04.017>.
- Barros L., P. Baptista and I. C. F. R. Ferreira (2006) Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotecnologica* 18:165-170, <http://dx.doi.org/10198/824>.
- Bowen G. D. (1973) Mineral nutrition of ectomycorrhizae: *In: Ectomycorrhiza, their ecology and physiology*. G. C. Marx and T. T. Kozlowsky (eds.). Academic Press, London Great Britain, pp:151-205.
- Bran M. C. del, R. Caceres, N. Gurriaran, O. Morales y R. Flores (2015) Caracterización *in vitro* y producción de inóculo de cepas guatemaltecas de *Lepista nuda* (Bull.: Fr.) Cooke. *Ciencia, Tecnología y Salud* 2:5-13.
- Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and Malajczuk (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR, Canberra, Australia. 373 p.
- Bücking H., E. Liepold and P. Ambilwade (2012) The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. *Plant Science*. N. Kumar Dhal and S. Charan Sahu (eds.). InTech. pp:107-138, <http://dx.doi.org/10.5772/52570>.
- Calonge F. D. (2009) “Guía de bolsillo para el buscador de setas”. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.158 p.

- Chávez D., G. Pereira y A. Machuca (2007) Crecimiento *in vitro* de cuatro especies de hongos ectomicorrícicos recolectados en plantaciones de *Pinus radiata*. *Agrociencia* 23:79-84, <https://www.researchgate.net/publication/242191381>.
- Child J. J., C. Knapp and D. E. Eveleigh (1973) Improved pH control of fungal culture media. *Mycologia* 65:1078-1086, <http://dx.doi.org/10.2307/3758289>.
- Cline M. L., R. R. C. France y C. P. P. Reid (1987) Intraspecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Canadian Journal of Botany* 65:869-875, <http://dx.doi.org/10.1139/b87-119>.
- Coleman M. D., C. S. Bledsoe and W. Lopushinsky (1989) Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Canadian Journal of Botany* 67:29-39, <http://dx.doi.org/10.1139/b89-005>
- Dames J.F., C. J. Starker and M. C. Sholes (1999) Ecological and anatomical characterisation of some *Pinus patula* ectomycorrhizas from Mpumalanga, South Africa. *Mycorrhiza*, 9:9-24, <http://dx.doi.org/10.1007/s005720050258>.
- Dennis J. J. (1985) Effect of pH and temperature on *in vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. Infortaion Report BC-X-273. Pacific Forestry Center. Canadian Forestry Service. 19 p.
- Díaz G., R. Flores y M. Honrubia G. (2009) Descripción de cultivos miceliares de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista Mexicana de Micología* 30:1-7, <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v30/v30a1.pdf>
- Dulmer, K. M., S. D. LeDuc and T. R. Horton (2014) Ectomycorrhizal inoculum potential of northeastern US forest soils for American chestnut restoration: results from field and laboratory bioassays. *Mycorrhiza* 24: 65-74, <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-013-0514-y>.
- Duñabeitia M. K., S. Hormilla, J. I. Garcia-Plazaola, K. Txarterina, U. Arteche and J. M. Becerril (2004) Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11-18, <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-003-0270-5>.

- Eng F., M. Gutiérrez-Rojas y E. Favela-Torres (2003) Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Revista Iberoamericana de Micología* 20:172-175.
- Frioni L. (1999) Estrategias nutritivas y bionérgicas en los microorganismos. Efecto del ambiente. *In: Procesos Microbianos*. L. Frioni (ed.). Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. pp:2-14.
- García-Rodríguez J. L., J. Pérez-Moreno, A. Aldrete, V. Cetina-Alcalá y H. Vaquera-Huerta (2006) Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coke et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* 40:665-676, <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/sep-oct/art-11.pdf>
- Guerin-Laguette A., C. Plassard and D. Mousain (2000) Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 790–799.
- Gerhardt E., J. Vila, X. Llimona (2000) “Hongos de España y de Europa”. Barcelona, España. Omega. 957 p.
- Giltrap N. J., and D. H. Lewis (1981) Inhibition of growth of ectomycorrhizal fungi in culture by phosphate. *New Phytologist* 87:669-675, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01701.x>
- Good N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa and R. M. Singh (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5:467-477, <http://dx.doi.org/10.1021/bi00866a011>.
- González M., I. Quiroz, R. Travieso, P. Chung y E. García (2015) Determinación de medios de cultivo y pH para la masificación *in vitro* de cepas de *Suillus luteus* Aubl. asociadas a *Pinus radiata* D. Don y *Scleroderma citrinum* Pers. asociadas a *Eucalyptus globulus* Labill. de la Región del Biobío, Chile. *Revista Árvore*. 39:105-113, <http://dx.doi.org/10.1590/0100-67622015000100010>.
- Harley J.L. and S. E. Smith (1983) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, Great Britain. 483 p.

- Hilger, A. B., K. I. Thomas, and H. H. Krause (1986) The effects of several buffers on growth and phosphorus nutrition of selected ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 18:61-67, [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(86\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90104-5).
- Honrubia M., P. Torres, G. Díaz y A. Cano (1992) Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 p.
- Honrubia M, P Torres, G. Díaz y A. Morte (1995) Biotecnología Forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas. Murcia, España. 84 p.
- Honrubia M., V. Figueroa, J. Fajardo, A. Verde, D. Branco y F. Sánchez (2010) Guía de hongos MICODES. Edita MICODES (Micología, Conservación y Desarrollo). Murcia, España. 281 p.
- Hung L-L. and J. M. Trappe (1983) Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia* 75:234-241, <http://dx.doi.org/10.2307/3792807>.
- Hutchison L. J. (1990) Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. *Canadian Journal of Botany* 68:1522-1530, <http://dx.doi.org/10.1139/b90-194>.
- Inoue M. and T. Ichitani (1990) Optimum pH range for mycelial growth of *Pythium* spp. estimated by MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] buffer. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 31:191-196.
- Jha B. N., G. D. Sharma and A. K. Shukla (2006) Growth behaviour ectomycorrhizal fungi with different physical factors in vitro conditions. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences* 8:339-343.
- Kumar S. and T. Satyanarayana (2002) Isolation of ectomycorrhizal fungi: Methods and Techniques. *In: Techniques in mycorrhizal studies*. K. G. Mukerji, C. Manoharachary and B. P. Chamola (eds.). Dordrecht: Springer Netherlands. pp:133-142.
- Lazarević J., D. Stojičić and N. Keča (2016) Effects of temperature, pH and carbon and nitrogen sources on growth of *in vitro* cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. *Forest Systems* 25:1-10, <http://dx.doi.org/10.5424/fs/2016251-07036>.
- Lazo W. (2016) Hongos de Chile. Atlas micológico. Segunda Edición. Santiago, Chile. 316 p.

- Manero-Colín I. N., M. de L. Acosta-Urdapilleta, E. Montiel-Arcos y F. A. Medrano-Vega (2012) Otros hongos comestibles. 5.4. Cultivo de *Lentinula edodes* en aserrín de jacarandas con nutrientes *In*: J. E. Sánchez V. y G. Mata (eds.). Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica. Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México. pp:229-239.
- Marks G. C. and T. T. Kozlowski (1973) Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. Academic Press. New York & London. 444 p.
- Marx D., J. Ruehle and C. Cordell (1991) Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. *In*: Techniques for Mycorrhizal Research: Methods in microbiology. J. R. Norris, D. Read and A. K. Varna (eds.). Academic Press. London UK. pp:383-411.
- Marx D. H., W. C. Bryan and C. B. Davey (1970) Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. *Forest Science* 16:424-431.
- Murrieta-Hernández D. M., J. C. Noa-Carrazana, M. Mata-Rosas, M. del R. Pineda-López, R. Zulueta-Rodríguez y N. Flores-Estévez (2014) Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Pk.) Kuntze. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 20:101-107, <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.06.021>.
- Olivier J. and M. M. Norberg (2015) Positively skewed data: Revisiting the Box-Cox power transformation. *International Journal of Psychological Research (Medellin)* 3:68-77, <http://dx.doi.org/10.21500/20112084.846>.
- Pereira G., J. Herrera, A. Machuca y M. Sánchez (2007) Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque (Valdivia)* 28: 215-219, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002007000300005>.
- Pereira G., J. L. Campos, D. Chávez, L. Anabalón y C. Arraigada (2014) Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrícico *Lactarius aff deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. *Quebracho* 22(1,2): 30-39.
- Pirt S. J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation, Blackwell Scientific Publications. 274 p.

- Quoreshi A. M. (2008) The use of mycorrhizal biotechnology in restoration of disturbed ecosystem. *In: Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Z. A. Siddiqui, M. S. Akhtar and K. Futai (eds.). Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. pp:303-320.
- Rincón, A., J. Parladé and J. Pera (2005) Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerized *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Annals of Forest Science* 62: 817–822.
- Sánchez F., M. Honrubia and P. Torres (2001) Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie* 22:243-258.
- Sánchez J. E. y D. J. Royse (2001) La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. El Colegio de la Frontera Sur y LIMUSA, México. 294 p.
- Santelices R., S. Espinoza, N. Brunel and G. Palfner (2012) Effect of the geographical origin, culture media, and pH on the growth dynamic of the edible ectomycorrhizal mushroom *Suillus luteus*. *Ciencia e investigación agraria* 39:369-376, <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202012000200013>.
- Santiago-Martínez G., L.Varela, A. Estrada-Torres y V. Cuaxilo (1995) Efecto de seis medios de cultivo sobre el crecimiento de tres cepas de *Pisolithus tinctorius*. *Revista Mexicana de Micología* 11:57-68.
- Skinner M.F. and D. G. Bowen (1974) The uptake and translocation of phosphate by mycelial strands of pine mycorrhizae. *Soil Biology and Biochemistry* 6:53-56, [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(74\)90011-X](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(74)90011-X).
- Smith S. E. and D. Read (2008) “Mycorrhizal symbiosis”. Third Edition. Academic Press. Elsevier. Great Britain. 800 p.
- Steel R. G. D. and J. H. Torrie (1989) Bioestadística: Principios y procedimientos. 2ª ed. McGraw Hill. México DF, México. 662 p.
- Sundari S. K. and A. Adholeya (2003) Growth profile of ectomycorrhizal fungal mycelium: emphasis on substrate pH influence. *Antonie van Leeuwenhoek* 83:209-214, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12776915>.
- Vázquez-García A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres (2002) Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 73:1-15, <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40073101>

- Voroney R. P. (2006) Soil microbiology, ecology and biochemistry. *In: Soil Microbiology. Ecology and Biochemistry*. E. A. Paul (ed.). Third edition. Academic Press, Elsevier. Canada. pp:25-49.
- Willenborg A., D. Schmitz and J. Lelley (1990) Effects of environmental stress factors on ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 68:1741-1746, <http://dx.doi.org/10.1139/b90-224>.
- Yamanaka T. (2003) The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia* 95:584-589, <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2004.11833062>.



CAPÍTULO V

Crecimiento e intercambio gaseoso en plántulas del género *Pinus* inoculadas con hongos ectomicorrícicos en etapa de viverización⁵

Resumen

La micorrización controlada como práctica de cultivo supone un aumento de la calidad de planta producida en los viveros forestales, y con ello, mayor supervivencia y crecimiento de las plantas en campo. Plántulas de *Pinus canariensis*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. radiata* fueron inoculadas con suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus*, y *Suillus luteus*, por separado y en combinación, a fin de evaluar su efecto sobre las variables de crecimiento peso seco aéreo (PSA), peso seco radicular (PSR), variables de intercambio gaseoso (fotosíntesis (A_N) y conductancia estomática (g_s)). Las suspensiones esporales fueron preparadas a partir de carpóforos maduros recolectados en plantaciones de *P. radiata*. Las especies de *Pinus* fueron susceptibles de ser micorrizadas por los HECM probados. A 12 meses de la inoculación *P. canariensis* y *P. pinaster*, alcanzaron los mayores porcentajes de micorrización (PM), y *P. pinea* y *P. radiata* los PM más bajos. El mayor crecimiento aéreo se obtiene en plantas de *P. pinea* y *P. canariensis*. Las combinaciones de HECM S+RC2 y S+RC1 logran los más altos valores en PSA en las plantas de *P. pinea*, *P. canariensis* y *P. pinaster*. En peso seco radicular, la tendencia general es mayor desarrollo de esta variable en los tratamientos que presentan el mayor crecimiento aéreo. Para la tasa de fotosíntesis (A_N), *P. pinaster* y *P. pinea* fueron las especies que lograron las mayores tasas de A_N , y *P. radiata*, quien obtiene los valores más bajos; produciéndose diferencias significativas entre tratamientos a nivel de especie. *P. pinea* logra la mayor conductancia estomática (g_s), seguida de la especie *P. canariensis*. Los valores más bajos en g_s los obtiene *P. radiata*.

Palabras clave: Micorrización controlada, hongos ectomicorrícicos, inóculo esporal, especies de *Pinus*, crecimiento de plántulas, intercambio gaseoso.

⁵ García-Rodríguez, J.L., Pereira-Cancino, G., Pérez-Moreno, J., Ríos-Leal, D., Saez-Delgado, P. y Sánchez-Olate, M. Crecimiento e intercambio gaseoso en plántulas del género *Pinus* inoculadas con hongos ectomicorrícicos en etapa de viverización. *Revista Argentina de Microbiología* (enviado).

Introducción

En la actualidad, el establecimiento de plantaciones forestales se realiza, en general, en sitios donde prevalecen condiciones ambientales caracterizadas por periodos prolongados de sequía con altas temperaturas y lluvias concentradas en pocos meses (Rincón *et al.* 2005). Por esta razón, se ha incrementado el interés en la búsqueda de estrategias de adaptación al cambio climático que puedan mejorar la supervivencia y el crecimiento de las plantas establecidas bajo estas condiciones (Sebastiana *et al.* 2013). Las especies de coníferas, particularmente las del género *Pinus*, requieren establecer asociaciones simbióticas con hongos ectomicorrícicos que les ayudan a captar nutrientes esenciales, principalmente nitrógeno, fósforo y agua (Meyer 1973, Read y Perez-Moreno 2003, Salgado-Salomón *et al.* 2009, Smith y Read 2010) mejorando la nutrición, el crecimiento y la adaptación de ellas a condiciones de campo (Rincón *et al.* 2007). La micorrización controlada de las plántulas está considerada entre las herramientas más importantes para asegurar calidad desde el vivero (Molina 1979, Pera y Parladé 2005, Ruiz-Díez *et al.* 2006, Rincón *et al.* 2007, Sebastiana *et al.* 2013).

La calidad de planta se define desde diferentes enfoques, Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo (2004) definen la calidad de la planta en términos de sus características morfológicas y fisiológicas. Las cuales se adquieren a través de la utilización de insumos y aplicación de técnicas de producción en relación con las mezclas de sustratos, nutrición, riego, manejo de plagas y enfermedades (Prieto *et al.* 2009) y la inducción de la simbiosis micorrícica por medio de la inoculación controlada con HECM de las plantas producidas en vivero (Lazarevic *et al.* 2012). La inoculación micorrícica no solo mejora el crecimiento de las plántulas, sino también su estado fisiológico al mejorar su capacidad fotosintética como consecuencia de una mejor captación de agua y acumulación de nutrimentos en su tejidos (Dosskey *et al.* 1991, Duñabeitia *et al.* 2004). Los beneficios son a través del micelio externo de los HECM (Read y Perez-Moreno 2003) formado a partir de las raíces micorrizadas, se trata de una red de hifas especializadas en la exploración, captación de agua y nutrientes, las cuales por su tamaño y cantidad incrementan substancialmente el área de absorción de las raíces (Branzanti *et al.* 1999, Pérez-Moreno y Read 2004, Barea *et al.* 2011).

En la actualidad, es posible elegir la combinación planta-hongo a utilizar, la época y el método de aplicación más adecuado que garantice la micorrización y el crecimiento de las plántulas (Chávez *et al.* 2009). Las fuentes de inóculo de HECM más utilizadas en vivero son las esporas y los cultivos miceliales producidos en laboratorio (Honrubia *et al.*, 1997, Bassani *et al.* 2013). Éstos últimos son eficaces pero su costo es elevado debido a que su cultivo requiere de insumos, equipos costosos y personal especializado (García-Rodríguez *et al.* 2006, Bassani *et al.* 2013). Las esporas son más frecuentemente utilizadas en programas de inoculación debido a que son abundantes en cuerpos fructíferos, son susceptibles de ser almacenadas y sobre todo por su fácil aplicación (Honrubia *et al.* 1992, Parladé *et al.* 1996, Brundrett *et al.* 2005). En la utilización de esporas es aconsejable la determinación de dosis óptimas de aplicación, es primordial obtener plantas micorrizadas a niveles aceptables, pero a dosis económicamente factibles, y por tanto, se debe experimentar con las dosis y combinaciones planta-hongo de acuerdo a las condiciones de producción (Pera y Parladé 2005).

Sin embargo, existe una gran variación en la respuesta a la inoculación debida a diferentes factores tales como el grado de compatibilidad entre hongo-hospedero y la dependencia micorrícica del hospedero (Ortega *et al.* 2004). En diversos trabajos de micorrización controlada se evalúa el crecimiento a través de parámetros morfológicos o fisiológicos de calidad de planta, pero casi siempre por separado. Estudiar de forma integral el crecimiento de plántulas a través de la evaluación de parámetros de estructura y forma de la planta, junto con variables de intercambio gaseoso relacionadas en el proceso de producción de biomasa vegetal puede ser ventajoso al momento de determinar el efecto de la inoculación micorrícica sobre la calidad de plantas inoculadas con HECM *versus* plantas no inoculadas. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la micorrización controlada con suspensiones esporales de dos especies de HECM, por separado y en combinación, a concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 esporas/planta como fuente de inóculo sobre el comportamiento de variables de crecimiento y fisiológicas en plántulas de cuatro especies de pino.

Materiales y métodos

Material vegetal e inóculo. Se utilizaron plántulas de *Pinus canariensis* C.Sm. ex DC, *Pinus pinaster* Ait., *Pinus pinea* L. y *Pinus radiata* D. Don obtenidas a través de siembra en almácigos. Previo a su siembra, las semillas recibieron un tratamiento de flotación por 48 horas para eliminar semillas inviables, posteriormente se desinfectaron en superficie con peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 30%, en agitación constante por 15 minutos) y luego se lavaron con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron aproximadamente a 1.5 cm de profundidad en recipientes plásticos de 25 x 20 x 15 cm (largo, ancho y altura) con vermiculita como sustrato de germinación. Para el establecimiento del ensayo, de los almácigos de cada especie, se seleccionaron plántulas de 5 cm de altura, las que fueron trasplantadas a envases de poliestireno expandido con 30 cavidades de 170 mL de capacidad, las cavidades se rellenaron con composta de corteza de pino. Cada especie de pino ocupó dos bandejas de 30 cavidades para la aplicación de los tratamientos correspondientes. El inoculante consistió en suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* Fr., y *Suillus luteus* L. Gray, cuyas esporas se obtuvieron de cuerpos fructíferos frescos maduros recolectados en plantaciones adultas de *Pinus radiata* D. Don creciendo en suelos arenosos de baja productividad de la provincia del Biobío, VIII Región, Chile (37° 20' 42.58" S, 72° 17' 55.15" O). La recolección se realizó durante los meses de junio a septiembre de la temporada 2015.

La identificación de las especies se realizó a través de características macroscópicas y microscópicas de sus carpóforos (Gerhardt *et al.* 2000, Calonge 2009, Lazo 2016). Las suspensiones fueron preparadas a partir de carpóforos adultos frescos y limpios de cada especie, los que se trituraron en licuadora eléctrica (homogeneizaron en un volumen variable de agua destilada para obtener suspensiones con densidades similares). Las suspensiones se envasaron y etiquetaron para su almacenamiento a 5°C para su conservación. De las suspensiones madre u originales de cada especie de HECM se tomaron 100 mL y se adicionaron 300 mL de agua destilada. A partir de esta dilución se realizaron los conteos de esporas y el ajuste de las concentraciones esporales a probar por medio de una cámara de recuento Neubauer (hematocitómetro). Se obtuvieron dos concentraciones esporales (C1=1x10⁷ y C2=1x10⁸) (Rincón *et al.* 2001, Lazarevic *et al.* 2012) para los HECM *R. luteolus*, *S. luteus* por separado,

y para la combinación de ambas especies, la combinación de especies se ajustó de igual forma a C1 y C2 al igual que para las especie por separado. La micorrización con las suspensiones esporales preparadas, se realizó un mes posterior al trasplante cuando el sistema radicular de las plántulas presentó raíces secundarias. A fin de mantener homogéneas las suspensiones esporales, éstas se mantuvieron en agitación durante la inoculación. De cada concentración esporal por especie de HECM y en combinación para cada especie de pino se aplicaron dos dosis de 6 mL / planta de solución con una jeringa auto-dosificadora tipo pistola inyetable (Walmur®) de 10 mL de capacidad. Esto en función de que el porcentaje de esporas viables decrece con el tiempo (Martínez *et al.* 2007). Cada dosis se aplicó en tres puntos alrededor de las plantas, y entre las dosis uno y la dosis dos hubo un mes de diferencia.

Condiciones e insumos de cultivo. Las condiciones dentro de la cámara de crecimiento consistieron en un fotoperiodo de 16-8 horas luz/oscuridad, $53 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR), $75 \pm 10 \%$ de humedad relativa del aire (HR) y 24°C de temperatura. Los sustratos de germinación y cultivo fueron previamente esterilizados (autoclave marca Huxley 350) en intervalos de 1h por día durante tres días a 120°C de temperatura y a 1.0 atmósferas de presión. En promedio, de acuerdo a las necesidades de riego se aplicaron 20 mL de agua por cavidad con una jeringa hipodérmica desechable de uso veterinario de la misma capacidad.

Evaluación de variables y diseño experimental. Las plantas se cultivaron durante 12 meses cuidando las variables ambientales, el riego, fertilización y condiciones fitosanitarias. Las variables evaluadas de crecimiento fueron: peso seco de la parte aérea (PSA) (g), peso seco de la raíz (PSR) (g), peso seco total (PST) (g) y el porcentaje de micorrización (PM) (%). El PM se calculó en el sistema radicular de plántulas de *P. canariensis*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. radiata*, seleccionando aleatoriamente tres plantas por cada tratamiento. De cada planta se tomaron raíces primarias y se lavaron con agua para eliminar los residuos del sustrato de crecimiento. En las raíces de segundo y tercer orden se registró el número de ápices radiculares micorrizados y no micorrizados mediante la observación con una lupa estereoscópica de alta resolución (Olympus modelo SZ2-ILST). El PM resultó de la razón del número de ápices de

raíces micorrizadas entre la suma de ápices radiculares micorrizados y no micorrizados al igual que Carrera-Nieva y López-Ríos (2004).

Las variables instantáneas de intercambio gaseoso fueron: tasa de fotosíntesis instantánea (A_N) y conductancia estomática (g_s). Ambas variables se evaluaron entre las 9:00 y las 13:00 hrs en un conjunto de acículas correspondientes al tercio superior de cuatro plantas seleccionadas aleatoriamente por cada tratamiento. Se utilizó un sistema analizador de intercambio gaseoso (Li-6400XT Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). El equipo cuenta con luz led, para las mediciones se mantuvieron constantes parámetros como la saturación lumínica ($1,500 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura (24°C), flujo de aire ($300 \mu\text{mol s}^{-1}$) y concentración de CO_2 ($400 \mu\text{mol}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$). Cada medición tuvo un tiempo de duración de 3 a 5 minutos, dependiendo de la estabilidad de las variables evaluadas. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial. Los tratamientos resultaron de dos especies de HECM por separado, la combinación de ambas especies y de dos concentraciones esporales (C1 y C2) más un tratamiento testigo, sin inocular. Los siete tratamientos resultantes se aplicaron a cuatro especies de pino resultando 28 unidades experimentales con 3 repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza a cada una de las variables con una probabilidad al 95% y prueba de separación de medias de Tukey ($P < 0.05$) para determinar el mejor tratamiento y especie. Adicionalmente, para analizar la relación entre el porcentaje de micorrización (PM) y las variables de crecimiento y de intercambio gaseoso, se realizó un análisis de correlación construyendo una matriz de correlación para el cálculo de los coeficientes de correlación por el método de Pearson.

Resultados

Los resultados de la (Figura 5.1 a) indican que *P. pinea* presentó los mayores valores medios en peso seco aéreo (PSA), seguida de la especie *P. canariensis*; existiendo siempre un mayor crecimiento de esta variable en los tratamientos que recibieron inoculación con HECM. Sin embargo, estas diferencias no alcanzan significancia estadística ($P < 0.05$) entre tratamientos. Se observa que de las combinaciones de HECM probados los tratamientos S+RC2 y S+RC1 son

quienes logran los más altos valores de crecimiento en biomasa aérea para las especie *P. pinea*, *P. canariensis* y *P. pinaster*, y las plantas control (sin HECM) las que obtienen el valor más bajo (Figura 5.3a).

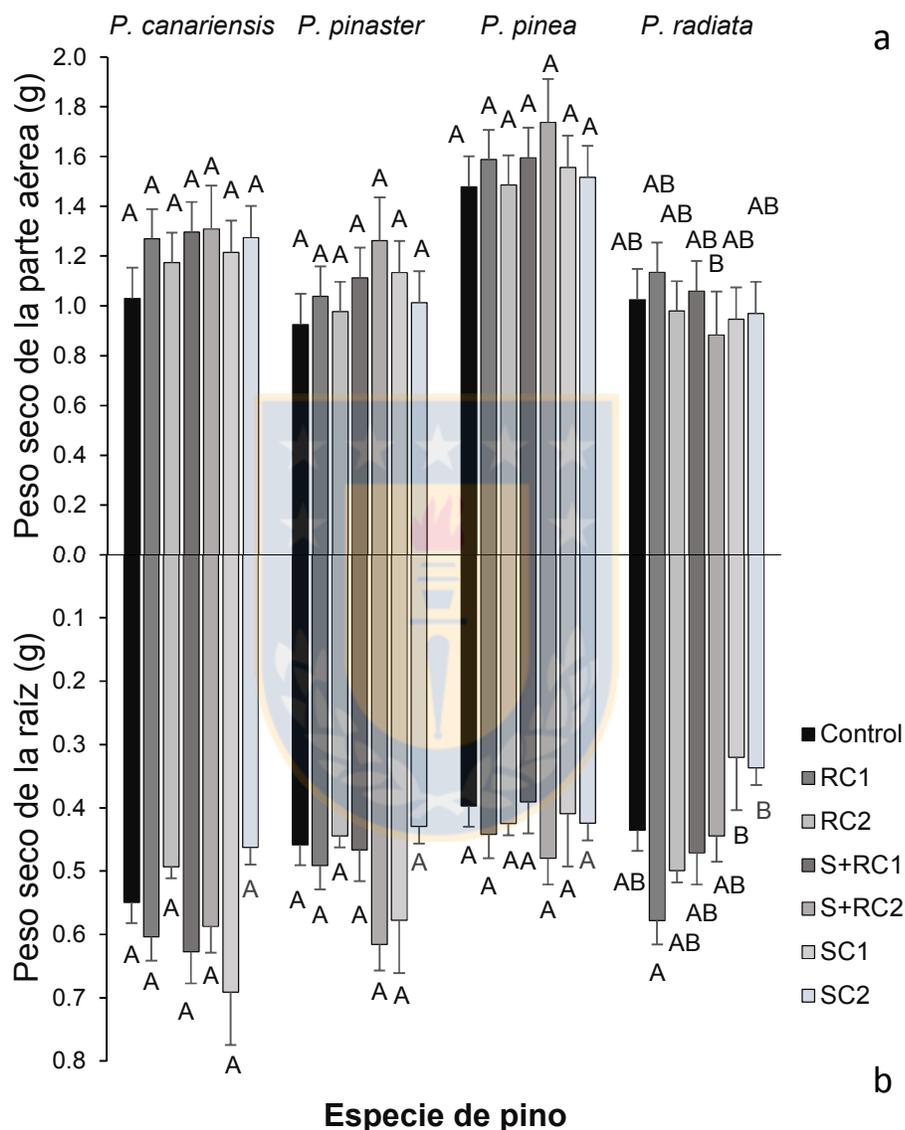


Figura 5.1 Producción de biomasa (peso seco) de plantas de cuatro especies de pino inoculadas los hongos ectomicorrícicos (HECM) *R. luteolus*, *S. luteus* por separado y en combinación en dos concentraciones esporales (C1 y C2). A) Biomasa aérea (g) y B) biomasa radical (g). Letras diferentes dentro de la especie denotan diferencias significativas Tukey ($P < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

En general, la especie *P. radiata*, independiente de los tratamientos con HECM probados, fue quien obtuvo los crecimientos en PSA más bajo, observándose crecimientos de las plantas tratadas con HECM (RC2, SC2, SC1 y S+RC2) inferiores al tratamiento control. En peso seco radicular (PSR), en general la tendencia es mayor desarrollo de esta variable en los tratamientos que presentan el mayor crecimiento aéreo, esto se expresa con claridad para las especies *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. radiata*, siendo esta última la única especie que presenta diferencias significativas a nivel de tratamiento (Figura 5.1 b).

Para la variable fotosíntesis instantánea (A_N), *P. pinaster* y *P. pinea* fueron las especie que lograron las mayores tasas de A_N , y *P. radiata*, quien obtiene los valores más bajos; produciéndose diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos a nivel de especie (Figura 5.2 a). Para las plantas de *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. canariensis* los valores promedios más altos se alcanzaron con el tratamiento inoculado con el HECM *S. luteus* (SC1), y las que logran los menores crecimientos, aquellas inoculadas con la especie *R. luteolus* (RC1) para *P. pinaster* y *R. luteolus* (RC2) para *P. pinea*. Para la especie *P. radiata* la inoculación con la combinación de los HECM *S. luteus* y *R. luteolus* (S+RC1) fueron las plantas que obtuvieron la mayor tasa de A_N , y las plantas inoculadas con el HECM *R. luteolus* (RC2), las que logran los menores crecimientos, existiendo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre estos tratamientos.

En la Figura 5.2 b, se observa que las plantas de *P. pinea* logran la mayor conductancia estomática (g_s) media, seguidas de la especie *P. canariensis*. Los valores más bajos de conductancia estomática (g_s) se obtienen en la especie *P. radiata*, produciéndose diferencias significativas ($P < 0.05$) a nivel de especie entre los tratamientos probados. Para *P. pinea* los mayores valores de g_s se logran con la combinación de los HECM *S. luteus* y *R. luteolus* (S+RC1) y la aplicación de sólo *S. luteus* (SC2). Para *P. canariensis* el mayor crecimiento se obtiene en el tratamiento con el HECM *R. luteolus* (RC2), quien logra diferencias significativas al compararse con el tratamiento de la combinación HECM *S. luteus* y *R. luteolus* (S+RC1).

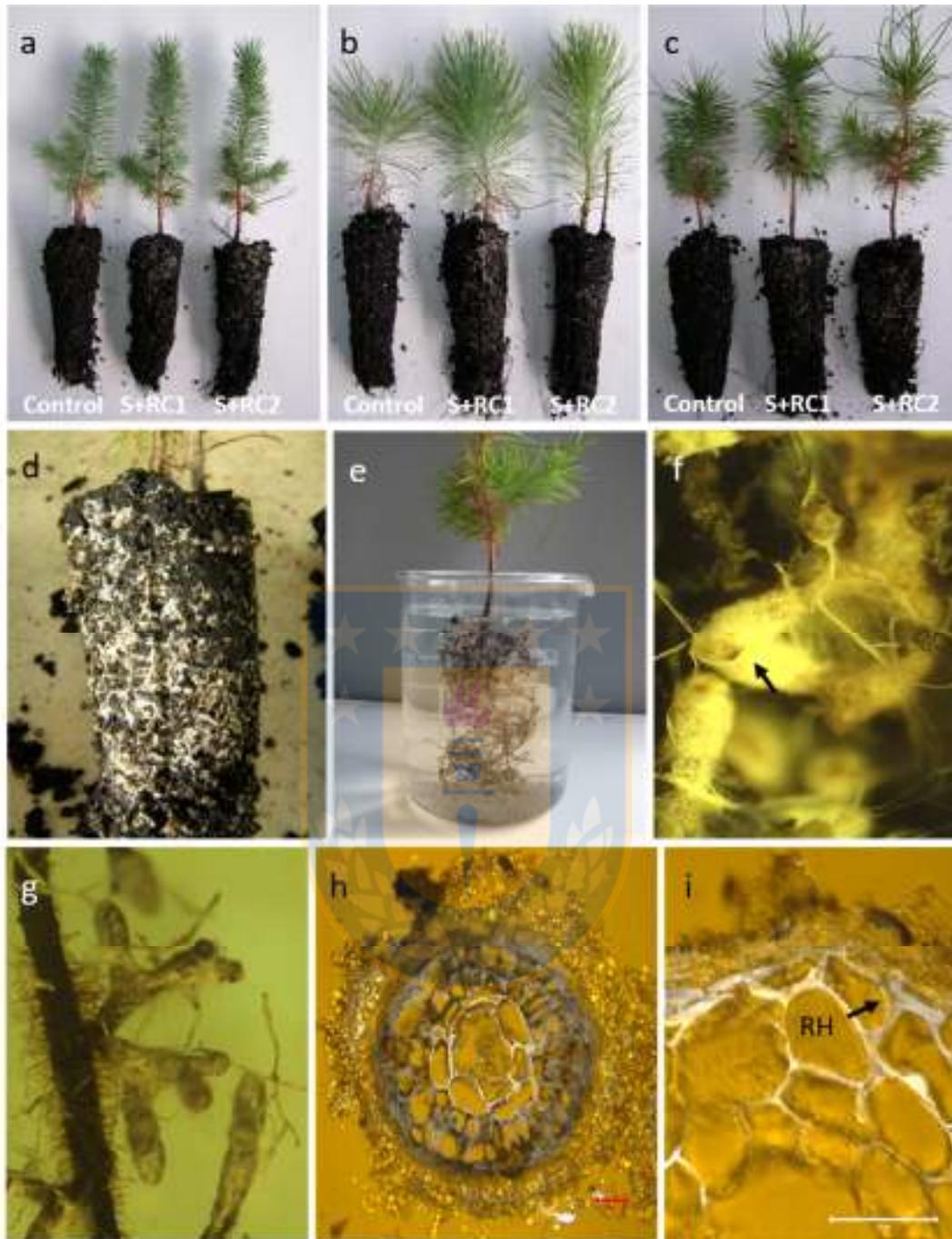


Figura 5.2 (a) Crecimiento de planta control e inoculada de *P. pinea*. (b) *P. canariensis*. (c) *P. pinaster*. (d) detalles de cepellón micorrizado. (e) sistema radicular de *P. pinaster* altamente micorrizado. (f) características de estructura micorrícicas de *R. luteolus*. (g). *S. luteus*. (h) corte transversal de raíz micorrizada. (i) característica de la red de Hartig intercelular. Fuente: Elaboración propia.

Los HECM ensayados, *R. luteolus* y *S. luteus*, dieron lugar a la formación en los sistemas radiculares de las plantas inoculadas de estructuras micorrícicas típicas de cada especie (Figura 5.3 f, g), con desarrollo de un manto fúngico y red de Hartig bien definida (Figura 5.3 h, i). La micorrización alcanzada por las plantas se presenta en la Figura 5.2 c, se observa en general, que *P. canariensis* y *P. pinaster* fueron las especie que lograron los mayores porcentajes de micorrización, y que *P. pinea* y *P. radiata*, las tasas más bajas; produciéndose para algunas especies (*P. canariensis* y *P. radiata*) diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$) a nivel de tratamientos.

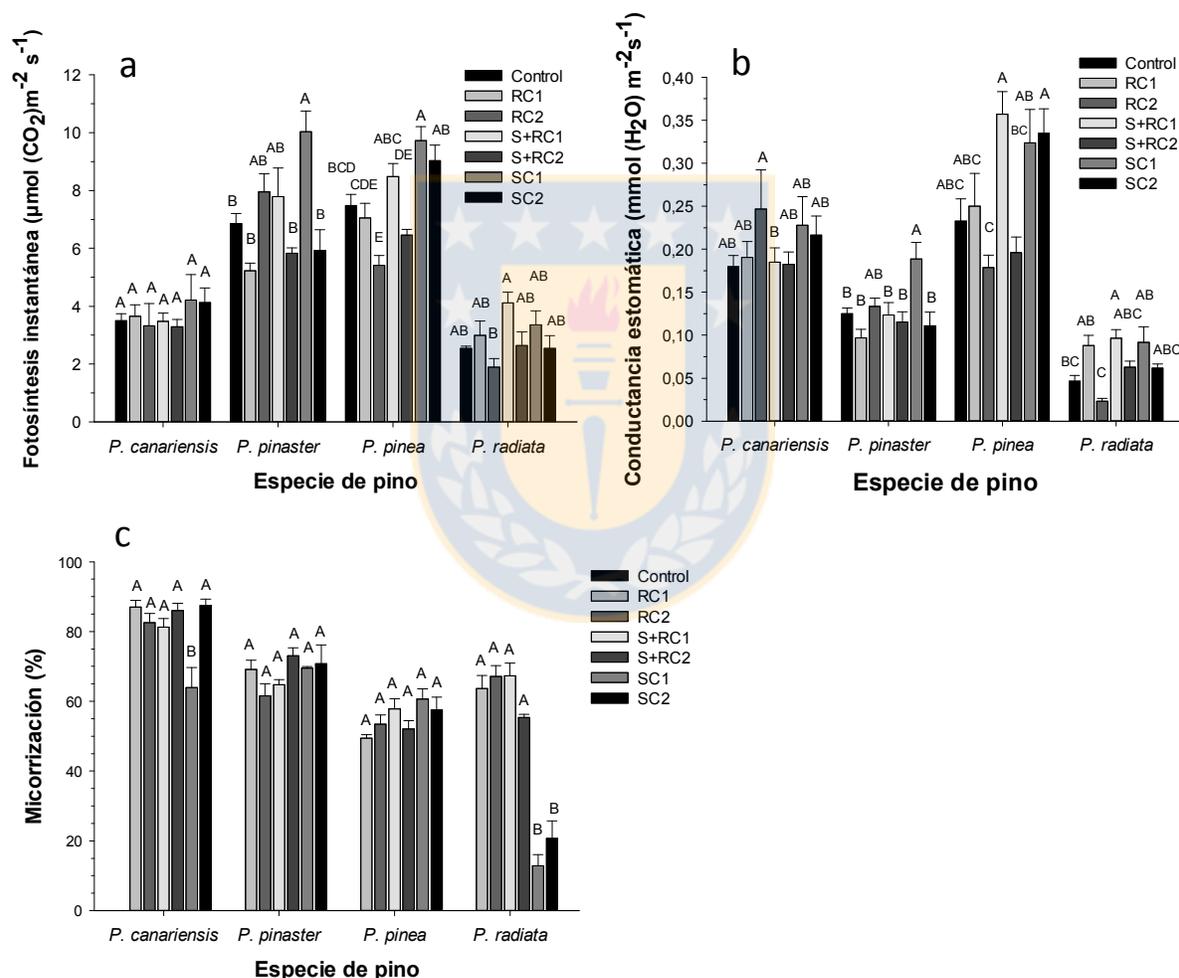


Figura 5.3 Parámetros de intercambio gaseoso (a, b) y morfológicos de crecimiento (c) de plantas de cuatro especies de pino inoculadas los hongos ectomicorrízicos *R. luteolus*, *S. luteus* por separado y en combinación a dos concentraciones esporales. Letras diferentes dentro de la especie denotan diferencias significativas Tukey ($P<0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Se observa que para *P. canariensis* todos los tratamientos (a excepción del HECM *S. luteus* SC1) logran una tasa de micorrización por sobre el 80%, con presencia de gran cantidad de micelio y estructura micorrícicas (Figura 5.2 d, e). Para la especie *P. radiata* los valores más bajos de micorrización (13 y 21%) se obtienen en los tratamientos con el HECM *S. luteus* (SC1 y SC2), produciéndose diferencias significativas ($P<0.05$), respecto a los demás tratamientos.

La correlación del porcentaje de micorrización (PM) con los parámetros de crecimiento y de intercambio gaseoso explicado en términos de la proporción compartida, muestra por medio del coeficiente de determinación que PM y el PSR comparten un 21% ($r^2=0.21$) de elementos y que PM tuvo correlaciones negativas con A_N y g_s moderada y baja respectivamente, siendo en términos del coeficiente de determinación el 31% ($r^2=0.31$) de la A_N y del 7% ($r^2=0.07$) con la g_s atribuidas al PM. Las correlaciones más importantes fueron las observadas entre las variables de intercambio gaseoso y variables de crecimiento. El coeficiente de determinación de la A_N con el PSA fue del 17% ($r^2=0.17$). Los coeficientes de determinación más altos se lograron para la g_s con las variables PSA con 48% ($r^2=0.48$) y PSR con 57% ($r^2=0.57$), observándose una mayor relación entre las variables de intercambio gaseoso con la variables de crecimiento.

Discusión

Las esporas de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *R. luteolus* y *S. luteus* en suspensión pueden ser una fuente de inóculo a emplear para micorrizar plantas del género *Pinus* en vivero. Al respecto, Honrubia *et al.* (1995), Bassani *et al.* (2013), Steffen *et al.* (2017) mencionan que las esporas de HECM como fuente de inóculo para la producción de plantas en vivero a gran escala es una buena opción, sencilla y eficaz, aunque su actividad decrece significativamente con el tiempo desde que sus esporas son cosechadas. Para la utilización de esporas en las prácticas de inoculación de plantas en vivero es aconsejable establecer las dosis óptimas de aplicación (Pera y Parladé 2005). Rincón *et al.* (2001), encontraron excelentes niveles de micorrización en *P. pinea* al aplicar suspensiones esporales a concentraciones de 1×10^7 esporas/planta. Para *Pseudotsuga menziessi* y *P. pinaster* crecidos en contenedor Parladé *et al.* (1996) utilizó rangos de inóculo esporal de 1×10^2 y 1×10^7 esporas/planta, encontrando dosis de

aplicación óptimas en rangos de 1×10^5 y 1×10^7 esporas/planta, para diferentes HECM. En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticas entre las dos concentraciones probadas 1×10^7 y 1×10^8 esporas/planta, lo que sugiere en futuros programas de micorrización con las especies de HECM probados el empleo de la dosis más baja por ser técnica, eficaz y económicamente factible. Las especies *P. canariensis*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. radiata*, muestran la susceptibilidad a ser micorrizados por los HECM *R. luteolus* y *S. luteus*, con desarrollo en el sistema radicular de estructuras micorrícicas bien definidas, manto fúngico y red de Hartig.

Los porcentajes de micorrización (PM) alcanzados a doce meses de la inoculación se consideran de niveles medios a altos de acuerdo con Tateishi *et al.* (2003). Más aún si se comparan con los resultados encontrados por Steffen *et al.* (2017) en plantas de *P. elliottii* (27.8%). Para la especie *R. luteolus* aplicada en forma individual o en combinación con *S. luteus* los resultados fueron superiores a los obtenidos por Chávez *et al.* (2009) en *P. radiata*. Al respecto, las diferencias en los PM que suelen ocurrir al realizar micorrizaciones controladas en viveros enfatizan la importancia de las especies, cepas o ecotipos de HECM a seleccionar y las técnicas de inoculación a utilizar (Cordell *et al.* 1987, Trappe 1987, González-Ochoa *et al.* 2003). Los resultados muestran que las plantas de *P. pinea* y *P. radiata* alcanzan menores PM que *P. canariensis* y *P. pinaster*. González-Ochoa *et al.* (2003), observan que a pesar que *P. pinaster* suele ser colonizado por HECM del género *Suillus* sp., es menos susceptible a ser colonizado que *P. halepensis*. Esto lo atribuyen a la menor cantidad de reservas en las semillas de *P. halepensis*, y por tanto, sus plántulas requieren desarrollar raíces finas rápidamente, reduciendo así el lapso de tiempo óptimo para su micorrización (Espigol 1999), en cambio, las semillas de *P. pinaster* con mayores reservas, el intervalo de tiempo para que se establezca la simbiosis hongo-planta es más largo. Sousa *et al.* (2012), observa que plantas de un genotipo seleccionado de *P. pinaster* establece una simbiosis más eficiente con hongos HECM en comparación con plantas de la misma especie provenientes de semilla de bosque natural.

Si bien la tendencia en el crecimiento aéreo, especialmente en *P. canariensis*, *P. pinaster* y *P. pinea*, es siempre mayor en las plantas inoculadas con HECM al compararlas con el tratamiento control, estos resultados no muestran un efecto significativo de la inoculación con

los HECM probados a doce meses de la viverización de las plantas. Ello concuerda con Honrubia *et al.* (1997), para *P. halepensis*, Rincón *et al.* (2005) para *P. pinea*, Martínez *et al.* (2007) para *P. ponderosa*, Chávez *et al.* (2009) para *P. radiata*, Lazarevic *et al.* (2012) para *P. nigra*. Duñabeitia *et al.* (2004), encuentran diferencias significativas en crecimiento aéreo para *P. radiata* dependiendo del tipo de HECM empleado, y del tipo de inóculo aplicado (Chávez *et al.* 2009). De igual forma Martínez-Reyes *et al.* (2012) reportan que el diámetro, la altura y la biomasa total de plantas de *P. greggi* inoculadas con el HECM *Hebeloma mesophaeum* aumentan hasta dos veces más su valor en comparación con plantas no micorrizadas. El tiempo de viverización de las plantas inoculadas puede jugar un rol importante en la respuesta en crecimiento. Rentería-Chávez *et al.* (2017), a dos años de la siembra encuentra diferencias significativas en crecimiento aéreo y radicular y en contenido de macro y micro nutrientes, entre plantas inoculadas y control. Johnson *et al.* (1997), afirman que es común encontrar que la respuesta de las plantas a la colonización micorrícica van de positivas a neutras o incluso negativas.

Esto último se comprueba en el presente estudio para el tratamiento aplicado a la especie *P. radiata*, en donde esta relación está representando un costo energético para la planta debido a que la funcionalidad de la simbiosis mutualística aún no está del todo establecida. Resultados similares han sido registrados por otros autores, Rincon *et al.* (2007b) para *P. pinea*, Domínguez-Núñez *et al.* (2013), para *P. halepensis*. Lo anterior se explicaría debido a que los hongos micorrícicos reciben un suministro directo de carbono de sus hospederos para la formación de diferentes estructuras (Finlay 2008), y en etapas tempranas de desarrollo la demanda de carbohidratos por parte de los hongos puede ser elevada (Stenström y Ek 1990, Dosskey *et al.* 1991). Por tanto, las asociaciones micorrícicas pueden ser parásitas dependiendo de la etapa de desarrollo de la planta, si las condiciones ambientales hacen que los costos sean mayores que los beneficios, o si los genotipos planta-hongo no forman asociaciones ventajosas (Johnson *et al.* 1997). Al respecto, Martínez *et al.* (2007), afirma que la inoculación con HECM, como práctica de cultivo en vivero, contribuye a garantizar la supervivencia y el buen crecimiento de las plantas en los sitios de reforestación, debido a que es donde la micorrización puede mostrar sus verdaderos efectos. Pereira (2002), sostiene que el éxito de la micorrización artificial de plantas no termina en vivero, allí es donde recién comienza, por cuanto esta

asociación lograda deberá persistir en el tiempo y de esta forma entregar todo su potencial a la planta huésped en campo. Pera y Parladé (2005), afirman que la utilización de plantas micorrizadas puede jugar un importante papel en la reforestación de zonas fuertemente alteradas por incendios forestales en las que la regeneración natural es muy baja o nula. Roldán y Albaladejo (1994), reportaron efecto positivos en el crecimiento de *P. halepensis* micorrizadas con *S. collinitus*, en suelos semiárido. Parladé (1999), encuentra efecto positivo en la estimulación del crecimiento en campo de *R. roseolus* para *P. pinea*. González-Ochoa *et al.* (2003), reportan que para *P. halepensis* y *P. pinaster* la micorrización incrementa la supervivencia de las plantas en campo. Díaz-Espejo *et al.* (2004), afirman que las plantas de *P. halepensis* micorrizadas con HEMC, a tres años de establecidas, logran efectos significativos en la supervivencia y crecimiento.

Los atributos morfológicos (altura, diámetro, producción de biomasa) han sido ampliamente utilizados para evaluar respuesta de las plantas a la micorrización (Honrubia *et al.* 1997, Rincón *et al.* 2005, Martínez *et al.* 2007, Chávez *et al.* 2009, Domínguez-Núñez *et al.* 2013). Menos frecuentes son los trabajos en donde se evalúan aspectos fisiológicos y estados de micorrización de las plantas (Makita *et al.* 2012). La tasa de fotosíntesis (A_N) y conductancia estomática (g_s) pueden ser variables respuestas importantes a tener en consideración en este tipo de estudios. Heinonsalo *et al.* (2010), afirma que diferentes especies de HECM tienen efectos variables en la tasa de fotosíntesis neta de la planta, lo que se traduce en que las especies de HECM pueden cambiar la cantidad de carbono que la planta fija de la atmósfera. Algunas especies pueden transferir nitrógeno (N) a la parte aérea de la planta (hongos nitrotolerantes *vs.* nitrofóbicos) (Gorissen y Kuyper 2000). El contenido de N en la hoja está relacionado directamente con la capacidad fotosintética (Evans 1989), además de la relación directa sumidero-fuente (Heinonsalo *et al.* 2010). Los resultados encontrados en el presente estudio no permiten determinar una tendencia clara del efecto de la inoculación con HECM sobre la tasa de A_N . Las especies, *P. pinaster* y *P. pinea* fueron quienes lograron las mayores tasas de A_N con el tratamiento de inoculación HECM *S. luteus* (SC1), sin embargo dichos tratamientos no son quienes logran las mayores tasas de crecimiento y porcentajes de micorrización.

La especie *P. canariensis* es quien obtiene los mayores PM pero con bajas tasas de A_N si se compara con *P. pinaster* y *P. pinea*. Al respecto, Makita *et al.* (2012), encontraron que la tasa de fotosíntesis fueron mayor en plántulas de *Quercus serrata* inoculadas con *Scleroderma citrinum*, *Laccaria amethystea* y *Astraeus hygrometricus* en comparación con las plantas del tratamiento control y de las inoculadas con *P. tinctorius*, sugiriendo que no todas las especies de HECM son efectivas para estimular la fotosíntesis. Agerer (2001), afirma que las especies de HECM pueden diferir en su demanda de carbón asimilado por las plantas y posteriormente en la respiración debido a su capacidad variable de formar micelio extraradical en el suelo. Dosskey *et al.* (1990), mostraron que *Rhizopogon vinicolor* aumentó la tasa de fotosíntesis probablemente porque el crecimiento abundante de las hifas desarrolló un sumidero sustancial de carbono y creó una alta demanda de fotosintatos. Nguyen *et al.* (2006), observan que plantas de *Picea mariana* tratadas con NaCl y de *Pinus banksiana* inoculadas con *Hebeloma crustuliniforme* mantuvieron tasas fotosintéticas relativamente altas e incluso la necrosis de acículas de plántulas de *Picea mariana* tratadas con NaCl se redujo por los hongos ECM.

Lambers *et al.* (1998) y Salguero *et al.* (2016), sostienen que la tasa de fotosíntesis depende básicamente de las condiciones de radiación, temperatura y agua disponible. Kim *et al.* (2004), afirman que las fuentes de luz que generalmente se utilizan para cultivo de plantas en ambientes controlados, como lámparas fluorescentes, de halogenuros metálicos, de sodio a alta presión (HPS) o incandescentes, aumentan los niveles de flujo de fotones fotosintéticos (densidad de flujo fotónico fotosintético, PPF) pero poseen longitudes de onda innecesarias y/o carecen de longitudes de onda específicas; por lo tanto, no son óptimos para promover el crecimiento. Fernández y Tapias (2004) al analizar el comportamiento fotosintético de plantas de *Pinus canariensis*, *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. pinaster*, *P. nigra*, *P. sylvestris* y *P. uncinata* cultivadas a dos intensidades de sombreado en vivero (50 y 80% de radiación incidente) muestran que a los cuatro meses, las plantas crecidas a mayor sombreado desarrollan tallos más alargados, con menor densidad de hojas, más ligeras (casi el doble de la superficie foliar específica (SLA)) que las crecidas bajo sol y además, presentan mayor tasa fotosintética por unidad de biomasa foliar. En muchas especies, la fracción de volumen de la epidermis disminuye al aumentar el grosor de la hoja, lo que da como resultado una mayor fracción de volumen de mesófilo y capacidad fotosintética (Niinemets *et al.* 1999). Salguero *et al.* (2016), encuentran que las

diferencias en las tasas fotosintéticas de clones de *Paulownia elongata* × *fortunei* se explican por los cambios estructurales del aparato fotosintético (por ejemplo cloroplastos y pigmentos fotosintéticos). Smirnakou *et al.* (2017), afirman que la calidad e intensidad óptimas de la luz para el crecimiento y desarrollo de las plantas es específica de cada especie y particularmente importante para el cultivo de plantas en ambientes de invernadero y cámara de crecimiento (fitotrón).

El comportamiento de la conductancia estomática (g_s) está relacionada con la A_N , sobre todo para las plantas de *P. pinea*, las que registraron los mayores valores para la g_s . *P. pinaster* a pesar de no ser tan elevados los valores de g_s , sus plantas presentan de igual forma altas tasas de A_N . Para las plantas de *P. canariensis* con las segundas mayores tasas de g_s , estos resultados no se corresponden con sus valores promedios de A_N , siendo los terceros más bajos después de los de *P. pinaster* y *P. pinea*. Bajo este criterio, la relación entre los promedios de g_s y A_N de plantas de *P. radiata* son las que más se corresponden. Pero la relación más importante de la g_s , de acuerdo al coeficiente de determinación, es con el PSA ($r^2=0.48$), relación que pueden explicar el promedio de A_N en plantas de *P. pinaster* y *P. pinea*, posiblemente debida a una mayor área foliar mayor cantidad y densidad de estomas, y con ello, mayor área de evapotranspiración.

En general plantas cultivadas en condiciones controladas caracterizadas por alta humedad, bajos niveles de CO₂ e iluminación, a menudo se asocia con el poco desarrollo del control estomático y en general con anomalías cuticulares. Lo anterior ocasiona plantas vulnerables a choques de trasplante (Hazarika 2006, Dias *et al.* 2014). Al respecto, Niinemets *et al.* (2007) al estudiar la variación de las características de acículas de *Pinus patula* y *P. radiata* debida a la luz, en general observan, que la fracción de volumen de las células del mesófilo aumenta a mayor irradiancia integrada (Q_{int}) y relación volumen/área total (V/AT), así como la fracción de hipodermis y epidermis disminuye al aumentar el grosor de la aguja. Esto enfatiza la importancia de las modificaciones anatómicas dependientes de la luz en la determinación de la capacidad fotosintética de la acícula. Las plantas que disponen de mayor radiación presentan un crecimiento mayor, lo que se evidencia en la producción de biomasa de las plantas crecidas con una sombra del 35 y 50 % (Santelices *et al.* 2011).

Sin embargo, de entre todos los factores ambientales que afectan a las plantas quizá sea la luz el que presenta la mayor heterogeneidad espaciotemporal. En una formación vegetal más o menos densa las hojas se superponen en niveles o capas sombreándose unas a otras (Reol 2003). Sobre este aspecto Robakowski y Bielinis (2017) al estudiar las acículas a lo largo de la copa de un individuo de *Abies alba* encuentran que la g_s disminuyó con el aumento del auto-sombreado de las acículas y se asoció con la reducción en la intensidad del intercambio de gases. Pero no detectan diferencias en la g_s con la edad de las acículas. Asimismo, el auto-sombreado de las ramas, que crece desde el primer año de incremento, ocasiona senescencia, modificaciones en la estructura de las acículas y disminución de la fotosíntesis. A baja luz actínica ($69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), rendimiento cuántico del fotosistema II (ϕ_{PSII}) disminuyó ligeramente con la edad y fue más bajo en las agujas de 6 años de edad. Bajo luz actínica superior, ϕ_{PSII} logró valores máximos en agujas de 2 y 3 años.

De igual forma factores ambientales inherentes al ambiente de producción como la luz, humedad, CO_2 (Mooney *et al.* 1991, Cetina Alcalá *et al.* 2001) o de las técnicas de producción como el estado nutricional mineral, el estado hídrico (Fernández y Tapias 2004) entre otros, pueden alterar el proceso de fotosíntesis en forma directa o indirecta en la planta. Asimismo, daños mecánicos o prácticas de cultivo, como las podas en vivero pueden influir en la A_N . Al respecto, (Cetina Alcalá *et al.* 2001) observan que podas del 25 y 50% del tallo con follaje de plantas de *Pinus greggii* de nueve meses de edad, incrementan la tasa de fotosíntesis neta en 50 y 80%, en los primeros dos meses, y en 30 y 60% en los dos últimos. Domínguez-Nuñez *et al.* (2004), observan que el momento en que la tasa fotosintética de *P. halepensis* es superior, coincide con la mayor tasa de micorrización de *Tuber melanosporum* Vitt., y cuando el número total de ápices radicales en planta micorrizada es más alto, ellos sugieren que las pérdidas de carbono por respiración radical y la demanda de carbohidratos del hongo estimulan la fotosíntesis. En el presente estudio las plantas de *P. canariensis* obtienen los mayores valores medios de PM y PSR, la elevada demanda de carbono por parte del hongo pudo afectar negativamente la acumulación de CO_2 necesario en la fotosíntesis. La relación entre la fotosíntesis (entrada de carbono) y la respiración simbiótica dependiente de la planta (producción de carbono) determina la capacidad de acumulación de CO_2 de una planta (Rygielwicz y Andersen 1994, Heinonsalo *et al.* 2010).

La conductancia es frecuentemente más alta en planta micorrizada bajo estrés hídrico (Augé *et al.* 1987, Lamhamedi *et al.* 1992, Duan *et al.* 1996, Morte *et al.* 2001) induciendo mayores tasas de fotosíntesis y contenidos hídricos más altos (Domínguez-Nuñez *et al.* 2004). Sin embargo, en el presente estudio y contrariamente a lo esperado la relación del PM con la A_N ($r^2=0.31$) y con la g_s ($r^2=0.07$) fueron negativas moderada y baja respectivamente. Aunque sin cuantificar, las dos especies de HECM probadas, por separado y en combinación, se caracterizaron por formar abundantes ápices micorrizados, micelio externo y rizomorfos, la demanda de carbohidratos en esta etapa de crecimiento de las plantas fue elevada. Ello pudo ser determinante para afectar negativamente la A_N y g_s . Los resultados obtenidos no muestran un efecto contundente de la inoculación ectomicorrícica sobre los parámetros de intercambio gaseoso o fisiológicos probados en este estudio [tasa fotosintética (A_N) y conductancia estomática (g_s)]. Las cuatro especies de pino probadas muestran diferentes respuestas adaptativas a las condiciones de luz, las plantas (*P. pinaster* y *P. pinea*) con mayor altura obtuvieron los mayores valores de A_N y en general son las únicas que se corresponden con sus valores de g_s .

En contraste a lo que se observa en plantas de *P. canariensis* las cuales logran los segundos valores más elevados de g_s , superiores a plantas de *P. pinaster* y *P. radiata*, pero su A_N es solo por poco mayor al de las plantas de *P. radiata*, no existiendo una concordancia entre estas dos variables. Esto supondría un menor control estomático por parte de las plantas de *P. canariensis*, y a las plantas de *P. pinaster* con un mayor control estomático que se refleja en una mayor A_N en general. Es posible que las especies presenten tolerancia diferencial a la baja iluminación, y que por ello las plantas de *P. radiata* hayan presentado menores valores de A_N y g_s . A pesar de haberse encontrado diferencias significativas ($P<0.05$) para algunos tratamientos respecto del PM, en las variables morfológicas y en las variables fisiológicas, no se encontró evidencia suficiente que permita definir un tratamiento absolutamente superior que nos indique la mejor combinación planta-hongo que mejore el cultivo de las plántulas bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio. Por lo anterior, es recomendable evaluar dichos tratamientos durante mayor tiempo, además de evaluarlos bajo las condiciones más cercanas al sitio de plantación.

Conclusiones

Las esporas de hongos ectomicorrícicos (HECM) *R. luteolus* y *S. luteus* en suspensión son una fuente de inóculo confiable, eficiente, de fácil aplicación y de relativo bajo costo. Las especies de pino utilizadas son susceptibles a formar simbiosis micorrícica con las dos especies de HECM probadas.

Las concentraciones en las suspensiones esporales probadas (1×10^7 y 1×10^8) no tuvo efecto significativo en el grado de micorrización lograda por las plantas en el periodo de estudio, siendo por ello recomendable la dosis más baja a utilizar en futuros programas de micorrización por ser técnica, eficaz y económicamente factible.

El porcentaje de micorrización (PM) producido por los HECM *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* tiene efecto positivo pero diferenciado sobre los valores medios de algunas variables morfológicas y fisiológicas en función de la combinación planta-hongo probadas.

No es posible definir la calidad de las plántulas de pino en los viveros forestales desde un punto de vista holístico, se hace recomendable el estudio de uno o más atributos morfológicos y fisiológicos, que incluyen parámetros físico-químicos que proporcionen información más exacta que pueda integrarse para determinar sobre la calidad de las plántulas producidas.

Aunque se encontraron diferencias significativas para algunas variables morfológicas y fisiológicas en función de los tratamientos aplicados, la evidencia es insuficiente para definir un tratamiento como superior que por tanto, indique de forma contundente la mejor combinación planta-hongo, por lo que es aconsejable proseguir con la evaluación de estos tratamientos durante mayor tiempo.

Agradecimientos

El apoyo del Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias de México (INIFAP, CORECADE NC13/83), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT 172007), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (CONICYT 2115253), por Beca de Doctorado a JL García-Rodríguez. Al Profesor Rodrigo Hasbún del Laboratorio de Epigenética, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción por facilitar la cámara de crecimiento vegetal.

Referencias

- Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Augé R, K Schekel, R Wample. 1987. Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimation. *Physiologia Plantarum* 70:175-182.
- Barea J, J Palenzuela, P Cornejo, I Sánchez-Castro, C Navarro-Fernández, A López-García, B Estrada, R Azcón, N Ferrol, C Azcón-Aguilar. 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of arid environments* 75:1292-1301.
- Bassani V, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2013. Spores of ectomycorrhizal fungi as inoculants for *Nothofagus pumilio* and exotic conifer seedlings in Patagonia, Argentina: their activity and conservation. *New Forests* 44:471-485.
- Branzanti MB, E Rocca, A Pisi. 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9:103-109.
- Brundrett M, N Malajczuk, G Mingqin, X Daping, S Snelling, B Dell. 2005. Nursery inoculation of *Eucalyptus* seedlings in Western Australia and Southern China using spores and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from different climatic regions. *Forest Ecology and Management* 209:193-205.
- Calonge FD. 2009. Guía de bolsillo para el buscador de setas. Madrid, España. Mundi-Prensa Libros.
- Carrera-Nieva A, G López-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10:93-98.

- Cetina Alcalá VM, ML Ortega, VA González Hernández, J Vargas Hernández, MT Colinas, Á Villegas Monter. 2001. Fotosíntesis y contenido de carbohidratos de de *Pinus greggii* engelmannii. En respuesta a la poda y al régimen de riego en vivero. *Agrociencia* 35.
- Cordell CE, JH Owen, DH Marx. Year. 1987. Mycorrhizae nursery management for improved seedling quality and field performance. In Proceedings of the Intermountain Forest Nursery Association Meeting, Oklahoma City, OK. 105-115 p.
- Chávez D, G Pereira, Á Machuca. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30:4-9.
- Dias M, C Correia, J Moutinho-Pereira, H Oliveira, C Santos. 2014. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 117:213-224.
- Díaz-Espejo A, AG Abobal, MH García. 2004. Utilización de micorrización controlada en la reforestación de un suelo agrícola con pino carrasco. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*:151-156.
- Domínguez-Núñez JA, M Saiz, C Calderon, J Saiz de Omeñaca. 2013. Physiological effects of *Rhizopogon roseolus* on *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Systems* 22:568-572.
- Domínguez-Núñez J, R Planelles, JR Barreal, JS de Omeñaca. 2004. Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Forest Systems* 13:317-327.
- Dosskey M, L Boersma, R Linderman. 1991. Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytologist* 117:327-334.
- Dosskey M, R Linderman, L Boersma. 1990. Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytologist* 115:269-274.
- Duan X, DS Neuman, JM Reiber, CD Green, AM Saxton, RM Augé. 1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* 47:1541-1550.
- Duñabeitia MK, S Hormilla, JI Garcia-Plazaola, K Txarterina, U Arteche, JM Becerril. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11-18.

- Espigol R. 1999. Estado actual del cultivo de *Lactarius deliciosus*. In: Colinas C. FC ed. Cultivo de hongos comestibles micorrícicos. Universidad de Lleida. Publicaciones Universidad de Lleida. p. 125-130.
- Evans JR. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78:9-19.
- Fernández M, MR Tapias. 2004. Influencia de la intensidad luminosa sobre la tasa fotosintética de plantas de una savia de pinos españoles. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*.
- Finlay RD. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59:1115-1126.
- García-Rodríguez JL, JP Moreno, A Aldrete, VMC Alcalá, HV Huerta. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* 40:665-676.
- Gerhardt E, J Vila, X Llimona. 2000. Hongos de España y de Europa. Barcelona, España. Omega. 957 p.
- González-Ochoa AI, J de Las Heras, P Torres, E Sánchez-Gómez. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Annals of forest science* 60:43-48.
- Gorissen A, TW Kuyper. 2000. Fungal species-specific responses of ectomycorrhizal Scots pine (*Pinus sylvestris*) to elevated [CO₂]. *New Phytol* 146:163-168.
- Hazarika B. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108:105-120.
- Heinonsalo J, J Pumpanen, T Rasilo, K-R Hurme, H Ilvesniemi. 2010. Carbon partitioning in ectomycorrhizal Scots pine seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1614-1623.
- Honrubia M, G Díaz, A Gutiérrez. Year. 1997. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. In I Congreso Forestal Hispano Luso, Libro de Acta, Tomo III. Pampolna. pp: 301-306 p.
- Honrubia M, P Torres, G Díaz, A Cano. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA: 47 p.*

- Honrubia M, P Torres, G Díaz, A Morte. 1995. "Biotecnología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas". Murcia, España. Secretariado de Publicaciones, Universidad de Murcia. 85 p.
- Johnson N, J Graham, F Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytol* 135:575-585.
- Kim S-J, E-J Hahn, J-W Heo, K-Y Paek. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 101:143-151.
- Lambers H, FSI Chapin, NTJ Ponds. 1998. Plant Physiological Ecology. New York. Springer.
- Lamhamedi MS, PY Bernier, JA Fortin. 1992. Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. *Tree physiology* 10:153-167.
- Lazarevic J, N Keca, A Martinovic. 2012. Mycorrhization of containerized *Pinus nigra* seedlings with *Suillus granulatus* under open field conditions. *Forest Systems* 21:498-507.
- Lazo W. 2016. Hongos de Chile. Atlas micológico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 223 p.
- Makita N, Y Hirano, T Yamanaka, K Yoshimura, Y Kosugi. 2012. Ectomycorrhizal fungal colonization induces physiological morphological changes in *Quercus serrata* leaves and roots. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175:900-906.
- Martínez-Reyes M, J Pérez-Moreno, L Villarreal-Ruiz, R Ferrera-Cerrato, B Xoconostle-Cázares, JJ Vargas-Hernández, M Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:183-192.
- Martínez DB, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque (Valdivia)* 28:226-233.
- Meyer F. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: Marks GC, TT Kozlowsky eds. Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. New York, USA. Academic Press. p. 87-105.

- Molina R. 1979. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lodgepole pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science* 25:585-590.
- Mooney AH, WE Winnor, EJ Pell. 1991. Response of Plants to Multiple Stress. CA. USA. Academic Press. Inc. 257 p.
- Morte A, G Díaz, P Rodríguez, J Alarcón, M Sánchez-Blanco. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* 44:263-267.
- Nguyen H, MC Polanco, J Zwiazek. 2006. Gas exchange and growth responses of ectomycorrhizal *Picea mariana*, *Picea glauca*, and *Pinus banksiana* seedlings to NaCl and Na₂SO₄. *Plant Biology* 8:646-652.
- Niinemets Ü, A Lukjanova, MH Turnbull, AD Sparrow. 2007. Plasticity in mesophyll volume fraction modulates light-acclimation in needle photosynthesis in two pines. *Tree physiology* 27:1137-1151.
- Niinemets Ü, J Tenhunen, N Canta, M Chaves, T Faria, J Pereira, J Reynolds. 1999. Interactive effects of nitrogen and phosphorus on the acclimation potential of foliage photosynthetic properties of cork oak, *Quercus suber*, to elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Global Change Biology* 5:455-470.
- Ortega U, M Dunabeitia, S Menendez, C Gonzalez-Murua, J Majada. 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.
- Parladé J, J Pera, IF Alvarez. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245.
- Parladé X. 1999. Comportamiento en campo de planta de reforestación inoculada con hongos ectomicorrícicos. Micorrización en áreas mediterráneas de la Península Ibérica. *Actas I Congreso Hongos: Micorrización. Cáceres.. Junta de Extremadura*:61-75.
- Pera J, J Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* 14:419-433.
- Pereira CG. 2002. Mycorrhizas, degraded soils and precisión silviculture. *Chilean Forestry News*.:17-19.

- Pérez-Moreno J, DJ Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29:239-247.
- Prieto RJA, JL García-Rodríguez, VJL Aguilar, AS Huchin, BJM Mejía. 2009. Producción de planta del género *Pinus* en vivero en clima templado frío. Durango, México. INIFAP.
- Ramírez-Contreras A, DA Rodríguez-Trejo. 2004. Efecto de calidad de planta, exposición y micrositio en una plantación de *Quercus rugosa*. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. 10:5-11.
- Read DJ, J Pérez-Moreno. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist* 157:475-492.
- Rentería-Chávez MC, J Pérez-Moreno, VM Cetina-Alcalá, R Ferrera-Cerrato, B Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista argentina de microbiología* 49:93-104.
- Reol EM. 2003. Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Revista Ecosistemas* 12.
- Rincón A, IF Alvarez, J Pera. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-271.
- Rincón A, MR de Felipe, M Fernández-Pascual. 2007. Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. with selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18:23-32.
- Rincón A, J Parladé, J Pera. 2005. Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Annals of forest science* 62:817-822.
- Robakowski P, E Bielinis. 2017. Needle age dependence of photosynthesis along a light gradient within an *Abies alba* crown. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:83.
- Roldán A, J Albaladejo. 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biology and Fertility of soils* 18:143-149.
- Ruiz-Díez B, AM Rincón, MR De Felipe, M Fernández-Pascual. 2006. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus* isolates from Central Spain for the selection of fungal inoculants. *Mycorrhiza* 16:465.

- Rygiewicz PT, CP Andersen. 1994. Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated below ground. *Nature* 369:58.
- Salgado-Salomón ME, M Rajchenberga, C Barroetaveña. 2009. Evaluación del estado micorrízico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. *Bosque* 30:127-134.
- Salguero D, F Muñoz, J Cancino, V Flórez, R Rubilar, E Acuña, R Olave. 2016. Intercambio gaseoso de dos clones de *Paulownia elongata* x *fortunei* al primer año de desarrollo vegetativo en tres sitios del centro-sur de Chile. *Gayana. Botánica* 73:438-452.
- Santelices R, RM Cerrillo, F Drake, C Mena. 2011. Efecto de la cobertura y de la fertilización en el desarrollo de plantas de *Nothofagus alessandrii* cultivadas en contenedor. *Bosque (Valdivia)* 32:85-88.
- Sebastiana M, VT Pereira, A Alcântara, MS Pais, AB Silva. 2013. Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L.(cork oak) nursery and field seedlings. *New Forests* 44:937-949.
- Smirnakou S, T Ouzounis, K Radoglou. 2017. Effects of continuous spectrum LEDs used in indoor cultivation of two coniferous species *Pinus sylvestris* L. and *Abies borisii-regis* Mattf. *Scandinavian Journal of Forest Research* 32:115-122.
- Smith SE, DJ Read. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Cambridge. Academic Press. 605 p.
- Sousa NR, MA Ramos, AR Franco, RS Oliveira, PM Castro. 2012. Mycorrhizal symbiosis affected by different genotypes of *Pinus pinaster*. *Plant and Soil* 359:245-253.
- Steffen GPK, RB Steffen, Rmd Morais, CW Saldanha, J Maldaner, TM Loiola. 2017. *Parapiptadenia rigida* mycorrhization with spores of *Scleroderma citrinum*. *CERNE* 23:241-248.
- Stenström E, M Ek. 1990. Field growth of *Pinus sylvestris* following nursery inoculation with mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research* 20:914-918.
- Tateishi T, K Yokoyama, N Kohno, H Okabe, T Marumoto. 2003. Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. *Soil science and plant nutrition* 49:641-645.
- Trappe JM. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*:5-25.

CAPÍTULO VI

Efecto de la disponibilidad hídrica del suelo de cultivo en la respuesta de parámetros morfofisiológicos en plantas de *Pinus* spp. micorrizadas y no micorrizadas

Resumen

Los beneficios de las micorrizas se manifiestan particularmente bajo condiciones de estrés debido a que ésta simbiosis tiene la capacidad para proveer los mínimos requerimientos de agua y nutrientes para la supervivencia de las plantas durante episodios de sequía. Se estudió el efecto de la disponibilidad hídrica del suelo sobre comportamiento de parámetros morfofisiológicos en plantas de *Pinus canariensis* y *P. pinaster* no micorrizadas, y micorrizadas con suspensiones esporales (1×10^7) de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus*, y *Suillus luteus* por separado. Las suspensiones esporales se elaboraron con carpóforos recolectados en plantaciones adultas de *P. radiata*. A los 12 (trasplante) y 24 (evaluación) meses se observó colonización micorrícica en ambas especies de pino. La inoculación de ambos HECM produjo efectos significativos ($P < 0.05$) y diferenciados en algunos parámetros analizados dependiendo de las combinaciones entre especies de micobiontes y fitobiontes probados. El potencial hídrico prealba disminuyó de acuerdo a la disponibilidad hídrica del suelo impuesta y provocó el ajuste osmótico en las plantas de las dos especies de pino. En plantas de *P. canariensis* los PM más altos fueron en el tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) con *R. luteolus* y en el tratamiento T1 (disponibilidad hídrica media) con *S. luteus*. Los mayores promedios para la ALT, PSA, IR y LMA en plantas inoculadas con *S. luteus*; asimismo, mayores promedios en PSA, PSRN y EUA se registraron en los tratamientos T0, T2 y T2, respectivamente. Los mayores promedios de PM para *P. pinaster* fueron en el tratamiento T1 con ambas especies de HECM y las mayores tasas de A_N en plantas inoculadas con *R. luteolus* y *S. luteus* en el tratamiento T2. El mayor PSA se observó en el tratamiento T0 y para la ALT, DAC y PSA cuando se inocularon con *S. luteus*. Particularmente, *S. luteus* bajo condiciones de déficit hídrico parece influir más en el comportamiento de algunas variables morfofisiológicas de plantas de las dos especies de pino.

Palabras clave: disponibilidad hídrica, estrés hídrico, uso de agua, ectomicorriza, *Pinus*.

Introducción

Entre los efectos del calentamiento global se encuentra la reducción de la disponibilidad de agua, se prevé que la frecuencia y la gravedad de las condiciones de estrés por sequía aumentará dramáticamente en los próximos decenios (Claeys y Inzé 2013). En diversas partes del mundo, sobre todo en verano, las sequías prolongadas ya afectan negativamente el crecimiento de la vegetación natural y las plantas cultivadas, y todo indica que los cambios climáticos recrudecerán cada vez más los efectos negativos de la escasez hídrica sobre los ecosistemas forestales o de bosque (Michelozzi *et al.* 2011). Las precipitaciones en muchas áreas están disminuyendo y son más erráticas, y la creciente escasez de agua dulce disponible para el riego es debida principalmente a la urbanización y el agotamiento de acuíferos (Jury y Vaux 2005, Pennisi 2008). El riego es una práctica común pero costosa para muchos cultivos, y aunque ayuda a mantener un nivel de humedad adecuado y asegura un crecimiento continuo (Johnson 1986), no es factible económicamente su aplicación en plantaciones con especies forestales. La supervivencia de las plantas terrestres depende de la capacidad de sus raíces para obtener agua y nutrientes del suelo (Cassab y Sánchez-Guevara 2011). Las especies elegidas como candidatas para la reforestación de áreas propensas a la sequía deben combinar tolerancia al estrés hídrico y algún interés económico o medicinal (Dias *et al.* 2014). Las plantas al estar enraizadas, son inmóviles, y para hacer frente a las condiciones ambientales que se les presentan (Cassab y Sánchez-Guevara 2011) han desarrollado mecanismos morfo-fisiológicos para hacer frente a las situaciones estresantes (Molina-Montenegro *et al.* 2011) como la escasez de agua, que varía en tiempo y gravedad de un lugar a otro, y de temporada en temporada (Pennisi 2008). Los hospederos en la asociación ectomicorrícica son principalmente plantas leñosas perennes. Ellas ocupan muy variados nichos en el mundo, y a menudo sus hábitats se caracterizan por una fuerte estacionalidad (Wan *et al.* 1999). Las raíces de los árboles suelen estar colonizadas por una diversa gama de microorganismos, muchas especies de árboles forman asociaciones simbióticas con hongos ectomicorrícicos (HECM), éstos mejoran la adquisición de nutrientes y agua de su huésped a cambio de carbohidratos (Kipfer *et al.* 2012). Entre los principales beneficios de la simbiosis ectomicorrícica a menudo se menciona que ésta mejora las relaciones hídricas y con ello el estado nutrimental de las plantas micorrizadas, sobre todo, en sitios con suelos pobres en nutrientes y con problemas de disponibilidad hídrica (Lehto y Zwiazek 2011). Así mismo, se

señala al micelio externo como la estructura de los HECM responsable del transporte de agua al hospedero, y que este transporte puede ser la diferencia entre la vida y la muerte (Boyd *et al.* 1986). Por lo tanto, se considera al micelio externo como una extensión del sistema radical de las plantas para la cosecha de agua, fósforo y nitrógeno principalmente (Tibbett y Sanders 2002, Querejeta *et al.* 2003, Querejeta *et al.* 2007). Por su parte, Read y Boyd (1986) sugieren que los beneficios de la colonización micorrícica, se manifiesten particularmente bajo condiciones de estrés, en beneficios análogos en la nutrición mineral, esto a través de su capacidad para proveer los mínimos requerimientos para la supervivencia de las plantas durante episodios de sequía. Sin embargo, existe gran variación en la respuesta a la inoculación que surge de factores como el grado de compatibilidad huésped-hongo, en la dependencia micorrícica del hospedero, la efectividad fúngica de acuerdo a las condiciones bióticas y abióticas del sitio de plantación y la abundancia y efectividad de los hongos nativos. Existen además la variación entre especies fúngicas y la variación dentro de la especie, que pueden hacer la diferencia en distintas condiciones (Lehto 1992). Por lo tanto, es esencial realizar ensayos en vivero y en campo bajo diferentes situaciones representativas de los sitios de plantación para evaluar las posibles ventajas económicas y operativas del uso biotecnológico de la simbiosis micorrícica en la producción forestal (Castellano 1996). La comparación de diferentes hongos micorrícicos y sus rasgos en relación con las relaciones hídricas de la planta es un tema de gran potencial tanto para entender sus funciones en los ecosistemas, y para sus aplicaciones prácticas en viveros forestales. Pero para ello, este tema requerirá una experimentación más extensa a largo plazo como ha venido siendo en la mayoría de los casos hasta ahora (Lehto y Zwiazek 2011). Al respecto, algunos autores mencionan que la inoculación micorrícica no puede convertirse en una práctica rutinaria a menos que se disponga de grandes cantidades de inóculo eficiente y económico (Castellano 1996, Ortega *et al.* 2004). Para entender estos aspectos en el presente trabajo se estudió el efecto de la disponibilidad hídrica del suelo de cultivo sobre comportamiento de variables morfológicas y variables fisiológicas de plantas de *Pinus canariensis* y *P. pinaster* no micorrizadas, y micorrizadas con suspensiones esporales (1×10^7) de los HECM *Rhizopogon luteolus* Fr., y *Suillus luteus* L. Gray por separado. Las suspensiones esporales fueron elaboradas a partir de carpóforos frescos recolectados en plantaciones adultas de *Pinus radiata* creciendo en suelos de arenales. El género *Rhizopogon* es uno de los que contiene especies con tolerancia a la sequía debido a que varias especies cuentan

con micelios externos fuertes que producen gran cantidad de rizomorfos (Brownlee *et al.* 1983, Boyle y Hellenbrand 1991, Duñabeitia *et al.* 2004). *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* son HECM que crecen asociados con especies de pino establecidas en suelos arenosos de la Región del Bío-Bío en Chile (Pereira *et al.* 2007). Se ha demostrado que *R. luteolus* y *S. luteus* mejoran el rendimiento y el establecimiento de la planta bajo estrés hídrico (Castellano 1996, Steinfeld *et al.* 2003, Atala *et al.* 2012, Chávez *et al.* 2014).

Materiales y métodos

Material vegetal e inóculo

Se utilizaron plántulas de *Pinus canariensis* y *Pinus pinaster* obtenidas a través de siembra en almácigos. Previo a su siembra, las semillas recibieron un tratamiento de flotación en agua durante 48 horas con el objetivo de eliminar las semillas vanas. La testa de la semilla se desinfectó por inmersión en H₂O₂ al 30% en agitación constante durante 15 minutos. Finalmente, con abundante agua destilada estéril las semillas fueron lavadas para eliminar de ellas los residuos del desinfectante. Como almácigos se utilizaron recipientes plásticos de 25 x 20 x 15 cm (largo-ancho-altura) rellenos con vermiculita, en estos recipientes las semillas se sembraron en promedio a 1.5 cm de profundidad. Plántulas de 5.0 cm de altura fueron trasplantadas a envases de poliestireno expandido con 30 cavidades de 170 mL de capacidad por cavidad. Las cavidades de los envases fueron rellenos con una mezcla de vermiculita, corteza compostada, perlita y turba (2:2:1:1 v/v). Como inoculantes se utilizaron suspensiones esporales de los hongos ectomicorrízicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* Fr., y *Suillus luteus* L. Gray. Las esporas de estos hongos se obtuvieron a partir de cuerpos fructíferos frescos recolectados en plantaciones adultas de *Pinus radiata* D. Don creciendo en suelos arenosos de baja productividad de la provincia del Biobío, VIII Región, Chile (37° 20' 42.58" S, 72° 17' 55.15" O). La recolección de carpóforos se realizó durante los meses de junio a septiembre, meses que corresponden a la temporada anual de fructificación de estas especies de HECM. La identificación de las especies fúngicas se realizó a través de las características macroscópicas y microscópicas de sus esporocarpos (Gerhardt *et al.* 2000, Calonge 2009, Lazo 2016).

Las suspensiones fueron preparadas a partir de esporocarpos frescos y limpios, que se molieron y mezclaron en volúmenes variables de agua destilada para obtener suspensiones con densidades similares. Las suspensiones se envasaron y etiquetaron para su conservación a 5°C. De las suspensiones madre de cada especie de HECM se tomaron 100 mL y se adicionaron 300 mL de agua destilada. A partir de esta dilución se realizaron los conteos de esporas y el ajuste de la concentración esporal de inoculación con una cámara de recuento Neubauer (hematocitómetro). Se obtuvo una concentración esporal 1×10^7 (Rincón *et al.* 2001, Lazarevic *et al.* 2012) para las especies de HECM *R. luteolus* y *S. luteus* por separado. La aplicación de las suspensiones esporales se realizó un mes posterior al trasplante cuando aparecieron raíces secundarias en el sistema de raíces de las plántulas. Para mantener homogéneas las suspensiones esporales, durante la inoculación, se mantuvieron en agitación constante. Plantas de cada una de las dos especies de pino utilizadas fueron inoculadas con las suspensiones esporales de las especies de HECM por separado. Por planta se aplicaron dos dosis de 6 mL de suspensión esporal con ayuda de una jeringa auto-dosificadora tipo pistola inyectable (Walmur®) de 10 mL de capacidad. Esto debido a que el porcentaje de esporas viables decrece con el tiempo (Martínez *et al.* 2007). Cada dosis se aplicó en tres puntos alrededor del tallo de las plantas; entre las dosis uno y dos hubo un mes de diferencia.

Condiciones e insumos de cultivo

El cultivo de las plantas fue en dos etapas, una en condiciones controladas y la segunda en invernadero. Las condiciones dentro de la cámara de crecimiento consistieron en un fotoperiodo de 16-8 (día-noche), $53 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR (Photosynthetically Active Radiation), $50 - 75 \pm 10 \%$ de humedad relativa del aire (HR) y 24°C. Para el cultivo de las plantas de pino se utilizaron envases de poliestireno expandido con 30 cavidades con capacidad de 170 mL por cavidad, las cavidades se rellenaron con composta de corteza de pino como sustrato de cultivo. Como sustrato de germinación se utilizó vermiculita y, para el cultivo en condiciones controladas, composta de corteza de pino. Ambos sustratos fueron previamente esterilizados (autoclave marca Huxley 350) en intervalos de 1h por día durante tres días a 120°C de temperatura y a 1.0 atmósfera de presión. En promedio, se aplicaron 20 mL de agua por cavidad con una jeringa hipodérmica desechable de uso veterinario de la misma capacidad. Después de 12 meses de cultivo en condiciones controladas, las plantas fueron trasladadas a un invernadero

con cubierta de policarbonato alveolar y bajo una malla raschel del 60% a modo de aclimatación durante un mes, después de este periodo se retiró la malla raschel. Plantas seleccionadas por características morfológicas (altura y diámetro de cuello) y libres enfermedades o daños. Las plantas se establecieron en bolsas de polietileno negro de 1500 mL de capacidad con suelo de arenales como sustrato. Se utilizó este suelo para semejar las condiciones de establecimiento en los sitios de plantación. La aclimatación al medio de crecimiento tuvo una duración de ocho semanas previas al inicio del ensayo. Para ello, las plantas se regaron cada dos días, manteniendo el sustrato entre un 75-100 % del contenido de humedad equivalente a la capacidad de campo (-0,03 MPa). Se fertilizó a nivel de sustrato cada siete días con la mezcla Anasac® (NPK 11-10-15, Ca (6.6) Mg (5.0) y S (3.0) Santiago, Chile) a una concentración de 1.0 g por litro de agua. Posterior al periodo de aclimatación, se establecieron tres tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo como se detalla más adelante. Las condiciones medias de cultivo al interior del invernadero se detallan en la Tabla 6.1, como dato de referencia se incluyó el PAR al exterior al invernadero.

Tabla 6.1 Condiciones promedio de cultivo de las plantas de pino al interior del invernadero en tres horarios del día y el comparativo de PAR al exterior del invernadero.

Hora del día	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)	PAR α ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	PAR λ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Mañana	18.01	58.58	163	638.29
Medio día	25.76	40.35	492	1,160.28
Tarde	27.67	34.91	237	896.30

α = PAR (Photosynthetically Active Radiation) promedio al interior del invernadero.

λ = PAR promedio al exterior del invernadero. Fuente: Elaboración propia.

Establecimiento de tratamientos

Inicialmente, para las plantas se establecieron dos condiciones con gradientes de humedad contrastantes: la primera correspondió al tratamiento control T0 (disponibilidad hídrica alta), el riego de las plantas en esta condición fue a capacidad de campo (-0.01 a -0.03 MPa); y de sequía, en la cual a las plantas se les redujo paulatinamente el riego para provocar en el suelo la

disminución progresiva de la cantidad de agua disponible para las plantas. Las plantas se mantuvieron al interior de un invernadero para evitar la adición no controlada de agua.

Tabla 6.2 Valores de la curva de retención de humedad del suelo arenoso, su correspondencia en Mpa y valores de calibración resultante para el contenido de humedad con el equipo TDR.

Atmósferas (Atm.)	Mega pascales (Mpa)	Contenido de Humedad (%)	TDR calibración (%)
0.10	-0.01	15.47	25.99
0.33	-0.03*	12.04	19.87
1.00	-0.10	10.26	16.69
5.00	-0.50	8.26	13.13
10.0	-1.00**	6.51	10.01
15.0	-1.50***	5.43	8.08

TDR (*Time Domain Reflectometry*) calibrado en base al contenido de humedad gravimétrico (CH_w , g de agua / g de sustrato) curva de retención de humedad obtenida en laboratorio. Tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo del cultivo * T0 (disponibilidad hídrica alta), ** T1 (disponibilidad hídrica media) y *** T2 (disponibilidad hídrica baja). Fuente: Elaboración propia.

Durante el desarrollo del ensayo, el monitoreo del contenido de humedad del sustrato se realizó cada dos días con un equipo TDR (*Time Domain Reflectometry*) previamente calibrado en base al contenido de humedad gravimétrico (CH_w , g de agua / g de sustrato) de muestras de sustrato a distintos niveles de humedad. Los valores obtenidos fueron posteriormente asociados a los valores de la curva de retención de humedad del suelo, y así se establecieron los potenciales hídricos del sustrato ($\psi_{sustrato}$) críticos para el ensayo. A partir de la disminución del contenido de humedad en la condición de sequía, se determinaron dos tratamientos, puntos o valores de muestreo en los cuales se evaluó el comportamiento morfofisiológico de las plantas inoculadas y no inoculadas de cada especie de pino utilizadas en el experimento. Cada tratamiento o punto de muestreo se estableció como el contenido de humedad del suelo (disponibilidad hídrica del suelo), resultando así tres tratamientos equivalentes a valores de potencial hídrico del suelo de cultivo que se denominaron de la siguiente forma: de -0.03 MPa (T0) (disponibilidad hídrica alta), -1.0 MPa (T1) (disponibilidad hídrica media) y -1.5 MPa (T2) (disponibilidad hídrica baja) (Tabla 6.2).

Evaluación de variables

Las plantas se cultivaron en total 24 meses en los cuales se cuidaron las variables ambientales, el riego, fertilización y condiciones fitosanitarias. Las variables morfológicas evaluadas fueron: altura (ALT) (cm) medida desde el cuello de la raíz a la yema apical, diámetro del cuello de la raíz (DAC) (mm) medido con pie de metro digital (Mitutoyo, Mod. CD-6), porcentaje de copa viva (% CV) porción de la parte aérea total ocupada por hojas vivas, peso seco aéreo (PSA) (g), peso seco de raíz (PSR) (g), peso seco de raíces nuevas (PSRN) (g) peso de las raíces que crecieron post-trasplante a partir pan de tierra original, índice de robustez (IR) resulta de la razón de la ALT (cm) entre DAC (mm). Con los datos de biomasa obtenidos en balanza analítica (RADWAG®, USA) se calculó el índice de calidad de Dickson (ICD) (Dickson *et al.* 1960) y el porcentaje de micorrización (PM) (%). El PM se calculó en el sistema radical de plántulas de *P. canariensis* y *P. pinaster* seleccionadas al azar, dos plantas por cada bloque resultando cuatro plantas por cada tratamiento. Por planta, en promedio, se tomaron 60 cm de raíces primarias, éstas se lavaron con agua para eliminar los residuos del sustrato de crecimiento. En las raíces de segundo y tercer orden se determinó el número de ápices de raíces micorrizados y no micorrizados con ayuda de una lupa estereoscópica de alta resolución (Olympus modelo SZ2-ILST). El PM resultó de la razón del número de ápices de raíces micorrizados entre la suma de ápices de raíces micorrizados y no micorrizados (Carrera-Nieva y López-Ríos 2004).

Las variables fisiológicas evaluadas fueron: el potencial hídrico pre-alba (Ψ_{pd}), medido con bomba de presión tipo Scholander (Soil Moisture Equipment Corp, CA, USA) en horarios de pre-alba (4:00 a 6:00 h). La medición se realizó en el tercio superior del tallo de tres plantas por tratamiento. Dado que todas las especies presentaban hojas en esa porción del tallo, estas tuvieron que retirarse y conservarse para ser consideradas en la determinación del PSA, al retirar las hojas, esta porción del tallo se cortó y quedó listo para realizar la medición. Para evitar la transpiración esta porción de la parte aérea de la planta se envolvió en papel aluminio, dejando solo fuera la parte del tallo. Cada porción fue colocada dentro de una bolsa plástica de cierre hermético. Por último, se acomodaron dentro de un cooler con gel congelado hasta realizar la medición. La tasa de fotosíntesis instantánea (A_N) y conductancia estomática (g_s) se evaluaron entre las 9:00 am y 13:00 pm en un conjunto de acículas correspondientes al tercio superior de cuatro plantas seleccionadas aleatoriamente por cada tratamiento. Se utilizó un sistema

analizador de intercambio gaseoso (Li-6400XT Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). El equipo cuenta con luz led, para las mediciones se mantuvieron constantes parámetros como la saturación lumínica ($2,000 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura (24°C), flujo de aire ($300 \mu\text{mol s}^{-1}$) y concentración de CO_2 ($400 \mu\text{mol}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{CO}_2$). Los parámetros de medición se determinaron en evaluación previa para obtener las curvas de asimilación de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a partir de seis plantas por especie, dos plantas por tratamiento de disponibilidad hídrica para plantas inoculadas y no inoculadas con los hongos ectomicorrícicos *R. luteolus*, *S. luteus* por separado (Figura 6.10 a, b). Cada medición tomó de 3 a 5 minutos de duración, dependiendo de la estabilidad de las variables evaluadas. La eficiencia en el uso de agua (*EUA*) se calculó como el cociente entre la tasa de fotosíntesis y la conductancia estomática (A_N/g_s). La masa foliar por área (*LMA*) o “Leaf mass área” en g cm^{-2} , se calculó tomando de todos los tratamientos con dos repeticiones por bloque una acícula del tercio superior de cuatro plantas por tratamiento (hojas completamente expandidas). Cada acícula se colocó sobre una hoja de papel que contenía los datos del tratamiento correspondiente y una línea de 1.0 cm de referencia impresa. Se tomó registro fotográfico de cada acícula y se calculó su área (cm^2) utilizando el software ImageJ 1.49 (Wayne Rasband/National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EE.UU). Posteriormente, las acículas fueron secadas en horno de ventilación forzada (Memmert, modelo BE-400) a 72°C hasta obtener su biomasa seca (g). El valor de la *LMA* resultó de multiplicar el peso seco (g) por el área (cm^2).

Diseño experimental y análisis estadístico.

El ensayo se analizó como un experimento factorial en un diseño en bloques completos al azar con dos repeticiones. Resultaron así 9 tratamientos por bloque, cada uno con 5 repeticiones (plantas) y dos repeticiones por bloque. Así se tuvieron un total de 90 plantas por bloque y 180 plantas por cada especie haciendo un total de 360 plantas por las dos especies. Las evaluaciones realizadas fueron incorporadas a una plantilla Excel y fue analizada con el software STATGRAPHICS. Se verificaron los supuestos distribucionales asociados a este modelo (Test Shapiro-Wilk y test de aditividad de Tukey). El test de Tukey se utilizó para las comparaciones aposteriori, en caso de interacción significativa se realizaron contrastes. El nivel de significancia utilizado fue del 0.05.

Resultados

En las plantas de *P. canariensis* existieron diferencias significativas en la altura (ALT) ($P<0.05$), en estas plantas el promedio más alto para esta variable se observó en plantas micorrizadas con el HECM *S. luteus* (H2T0, H2T1 y H2T2) (Tabla 6.2). El segundo promedio más alto para las plantas de esta especie de pino se observó cuando fueron inoculadas con *R. luteolus* (H1) y el menor promedio perteneció a plantas no inoculadas (H0) (Figura 6.1 a y Figura 6.2). El peso seco de la parte aérea (PSA) de plantas de *P. canariensis* de igual forma presentó diferencias estadísticas cuando estas fueron inoculadas con esporas de *S. luteus* en comparación con las plantas inoculadas con *R. luteolus* y plantas no inoculadas ($P<0.05$) (Figura 6.1 b). Por su parte, el índice de robustez (IR) presentó diferencias significativas cuando las plantas fueron inoculadas con *Suillus luteus* (H2) ($P<0.05$) (Figura 6.1c).

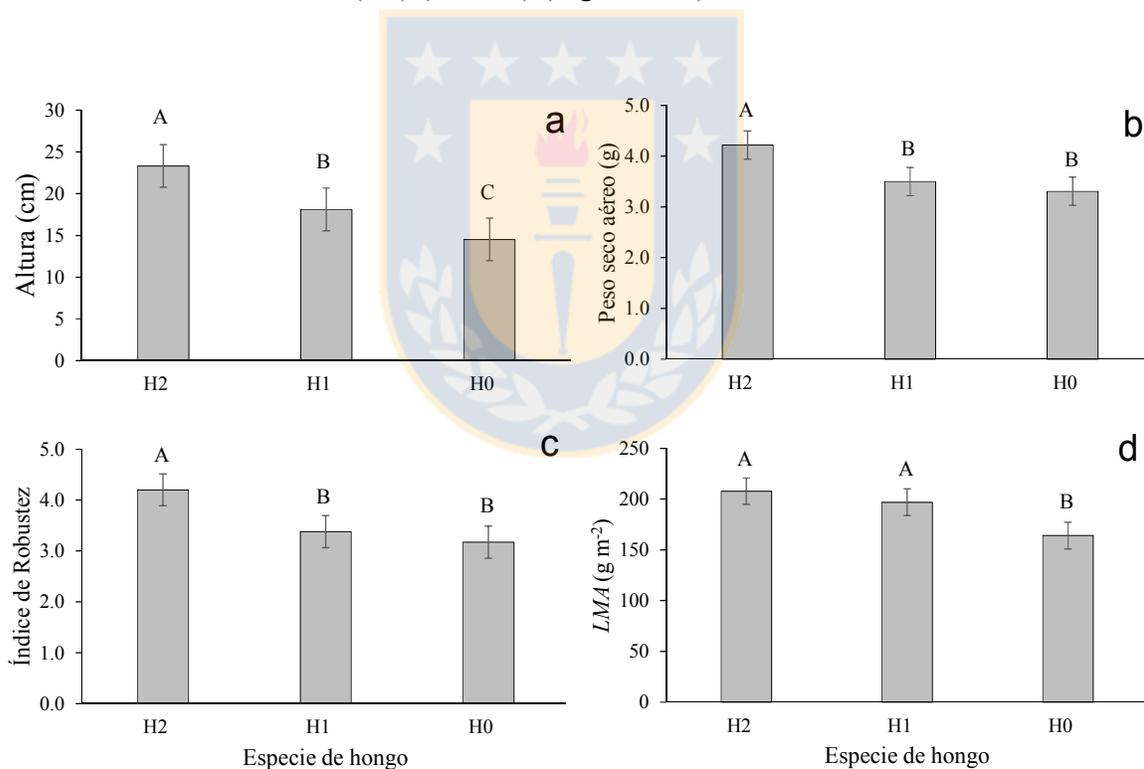


Figura 6.1 Parámetros morfológicos (a, b y c) y fisiológicos (d) de crecimiento en plantas de *P. canariensis* no inoculadas (H0) e inoculadas con suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey ($P<0.05$). Fuente: Elaboración propia.

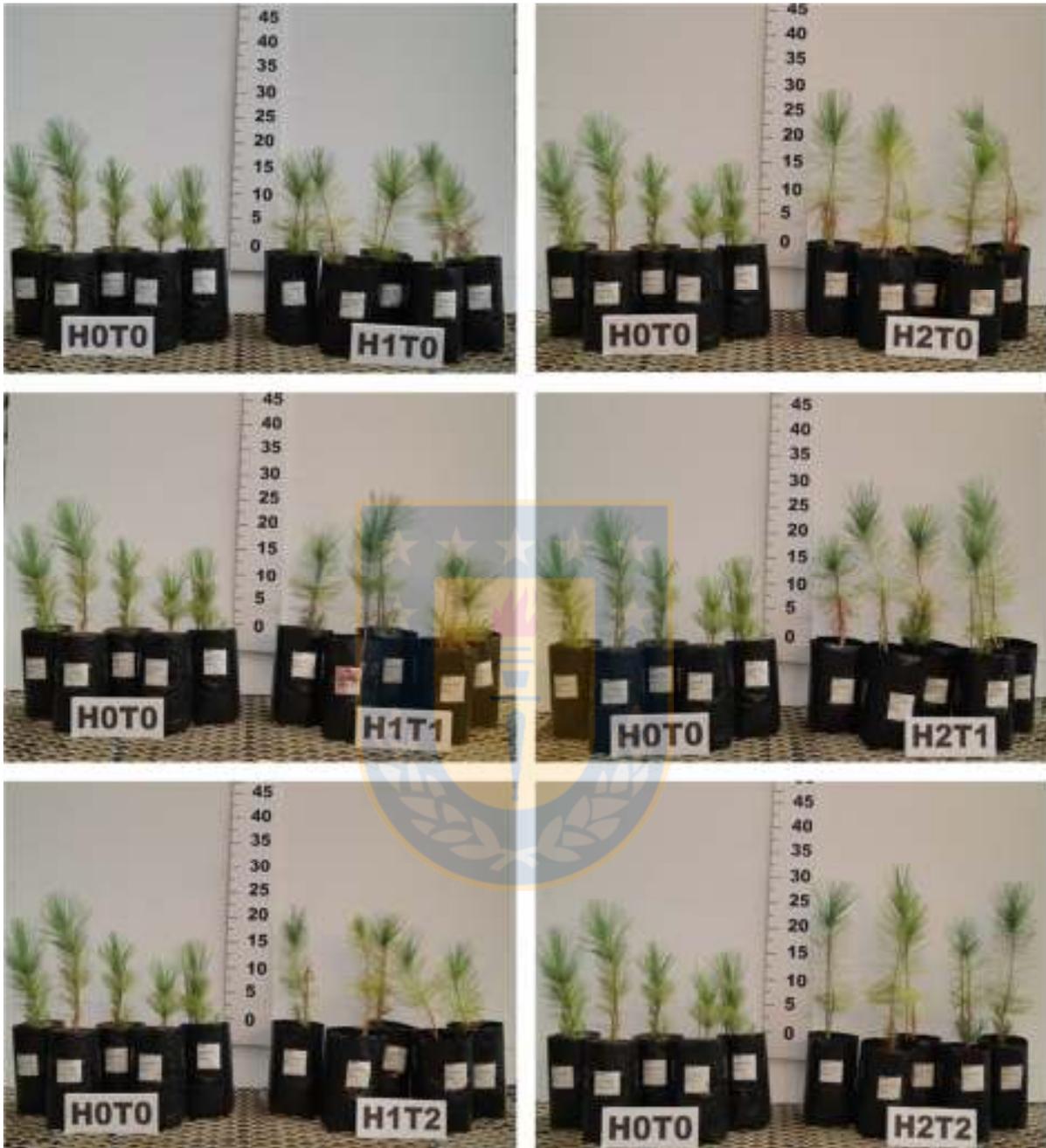


Figura 6.2. Plantas de *Pinus canariensis* inoculadas y no inoculadas con esporas de los hongos ectomicorrícicos *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2) sometidas a tres tratamiento de disponibilidad del suelo de cultivo T0 (disponibilidad hídrica alta, -0.03 MPa), T1 (disponibilidad hídrica media, -1.0 MPa) y T2 (disponibilidad hídrica baja, -1.5 MPa). Fuente: Elaboración propia.

Para la variable masa foliar por área “Leaf Mass per Area” (*LMA*), como factor, la especie de hongo sí ocasiona diferencias significativas para este parámetro ($P<0.05$), los mayores valores promedio para esta variable fueron observados cuando las plantas de *P. canariensis* fueron inoculadas con suspensiones esporales de *S. luteus* y *R. luteolus*, respectivamente, pero ambas diferentes a las plantas no inoculadas de esta misma especie de pino (Figura 6.1d). Se observó que el nivel de disponibilidad hídrica ocasiona también la existencia de diferencias significativas en cuanto al PSA ($P<0.05$), siendo el tratamiento de mayor disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0) el que mayor valor promedio presentó para esta variable (Figura 6.3 a). Para esta misma especie de pino, se observó que el tratamiento (T2) de menor disponibilidad hídrica del suelo promovió la existencia de diferencias significativas en el peso seco de raíces nuevas (PSRN) (Figura 6.3 b).

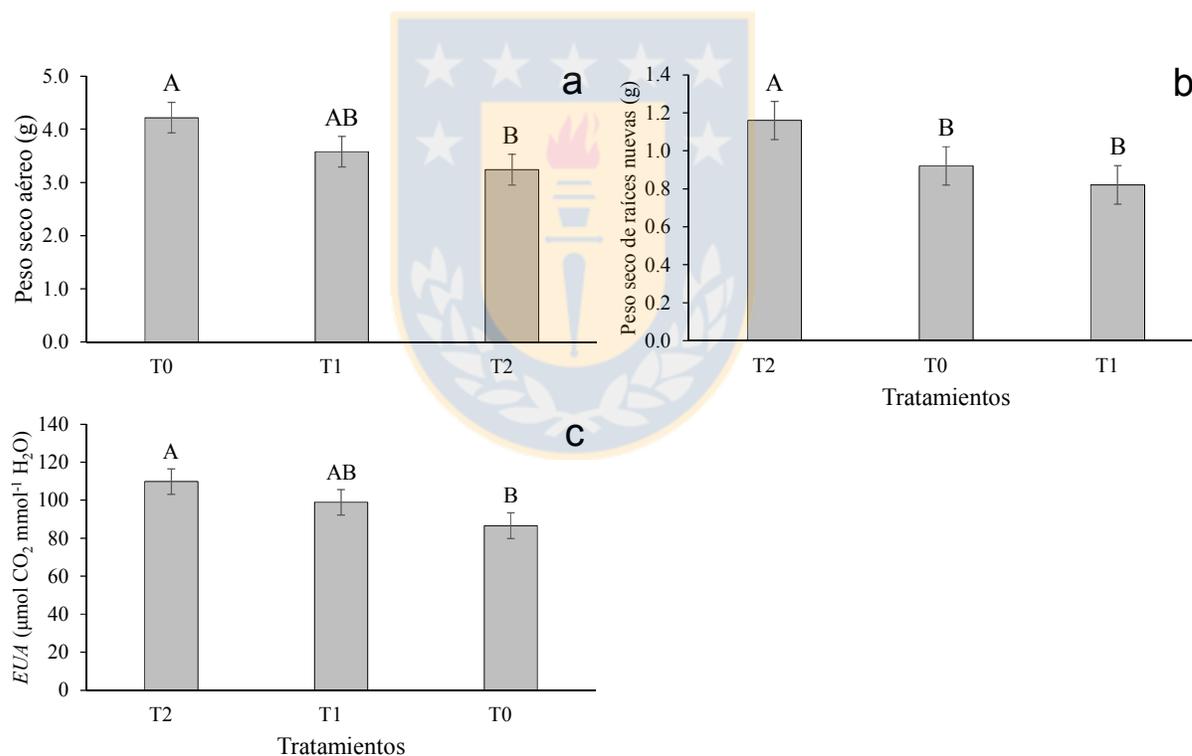


Figura 6.3 Parámetros morfológicos (a y b) y fisiológicos (c) de crecimiento en plantas de *P. canariensis* no micorrizadas y micorrizadas en respuesta a tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey ($P<0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Para las plantas de *P. canariensis* presentaron diferencias significativas en la eficiencia del uso del agua (UEA) ($P < 0.05$). Los mayores valores medios para esta variable se observaron en plantas en el tratamiento de menor disponibilidad hídrica del suelo (T2) y el menor valor medio de esta variable fue en el tratamiento de mayor disponibilidad hídrica (T0) (Figura 6.3 c). Sin embargo, la especie de HECM no tuvo un efecto significativo ($P = 0.3518$). Existieron interacciones especie de hongo y tratamiento en plantas de *P. canariensis*, estas interacciones significativas fueron para las variables porcentaje de micorrización (PM) y potencial hídrico prealba (Ψ_{pd}) ($P < 0.05$). Debido a que se utilizó suelo de arenales sin esterilizar como sustrato de cultivo, se presentó colonización ectomicorrícica en el tratamiento H0 (sin inocular), sin embargo, los porcentajes de colonización fueron bajos de menos del 20% (Figura 6.4 a).

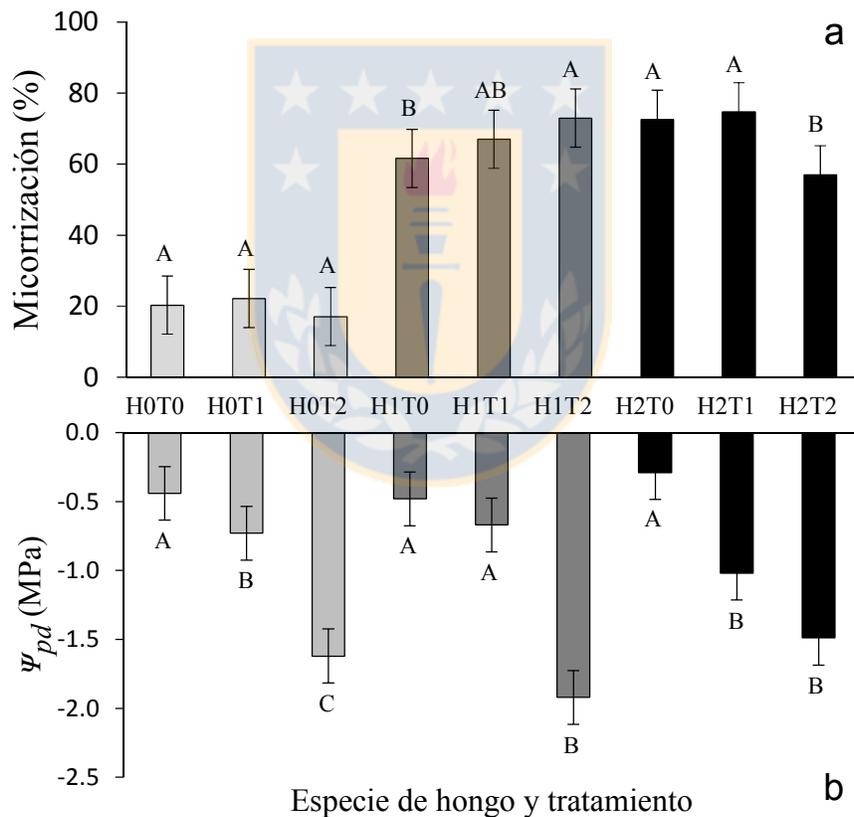


Figura 6.4 Porcentaje de micorrización (a) y potencial hídrico prealba (b) en plantas de *P. canariensis* no micorrizadas (H0) y micorrizadas con esporas de los HECM *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2) y su interacción con tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey ($P < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

En general las plantas de *P. canariensis* presentaron valores medios de PM mayores del 50% cuando fueron inoculados de forma controlada con suspensiones esporales de *R. luteolus* y *S. luteus*, esta especie de HECM produjo gran cantidad de micelio y rizomorfos en el suelo a los 24 meses de cultivo. Para plantas de *P. canariensis* inoculadas con *R. luteolus* los mayores valores medios de PM se observaron en el tratamiento T2 (72.00 %) ($P<0.05$) el de menor disponibilidad hídrica del suelo de cultivo, y para plantas de esta misma especies inoculadas con *S. luteus* los mayores valores medios de PM se presentaron en los tratamientos T1 (disponibilidad hídrica media) y T0 (riego a capacidad de campo) y los menores en T2 (baja disponibilidad hídrica) ($P<0.05$) (Figura 6.4 a). Durante la aplicación de los tratamientos, no se presentó mortandad de plantas atribuida a la disponibilidad hídrica del suelo de cultivo, por lo que en general se asume que el nivel de estrés hídrico alcanzado por las plantas de las plantas de esta especie de pino no fue excesivo o severo.

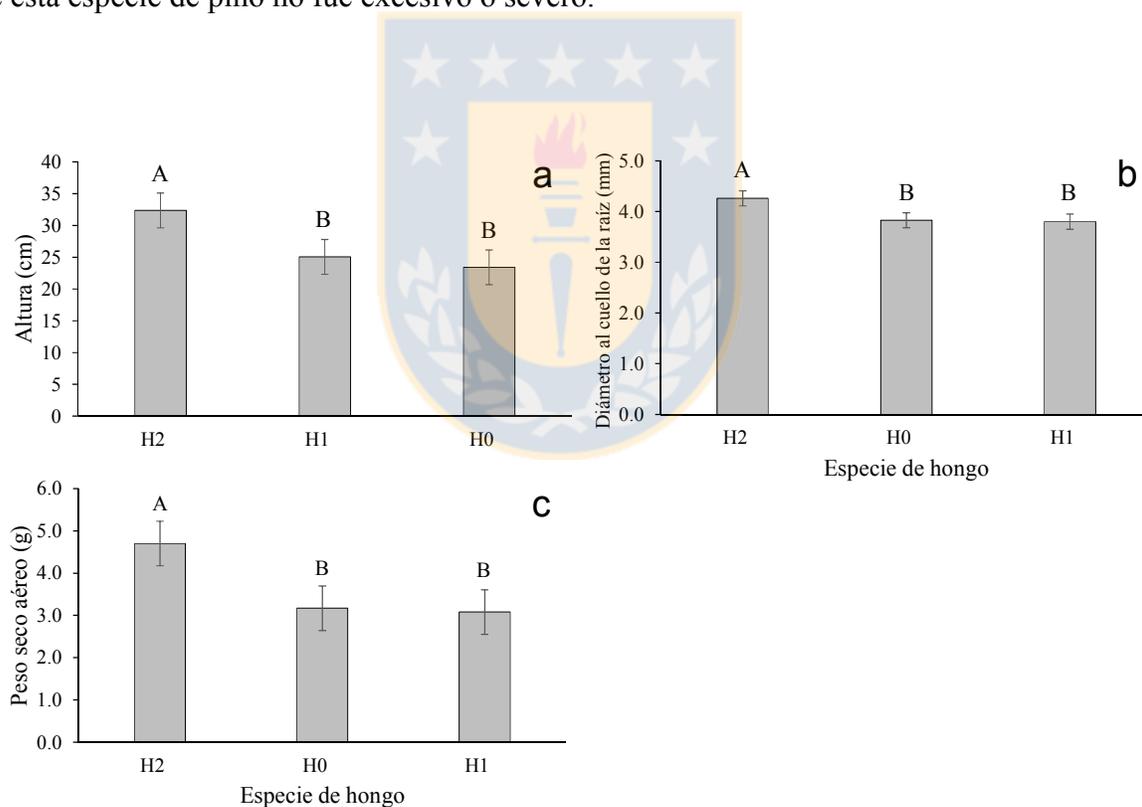


Figura 6.5 Parámetros morfológicos de crecimiento (a, b y c) en plantas de *P. pinaster* no inoculadas (H0) e inoculadas con esporas de los HECM *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey ($P<0.05$). Fuente: Elaboración propia.

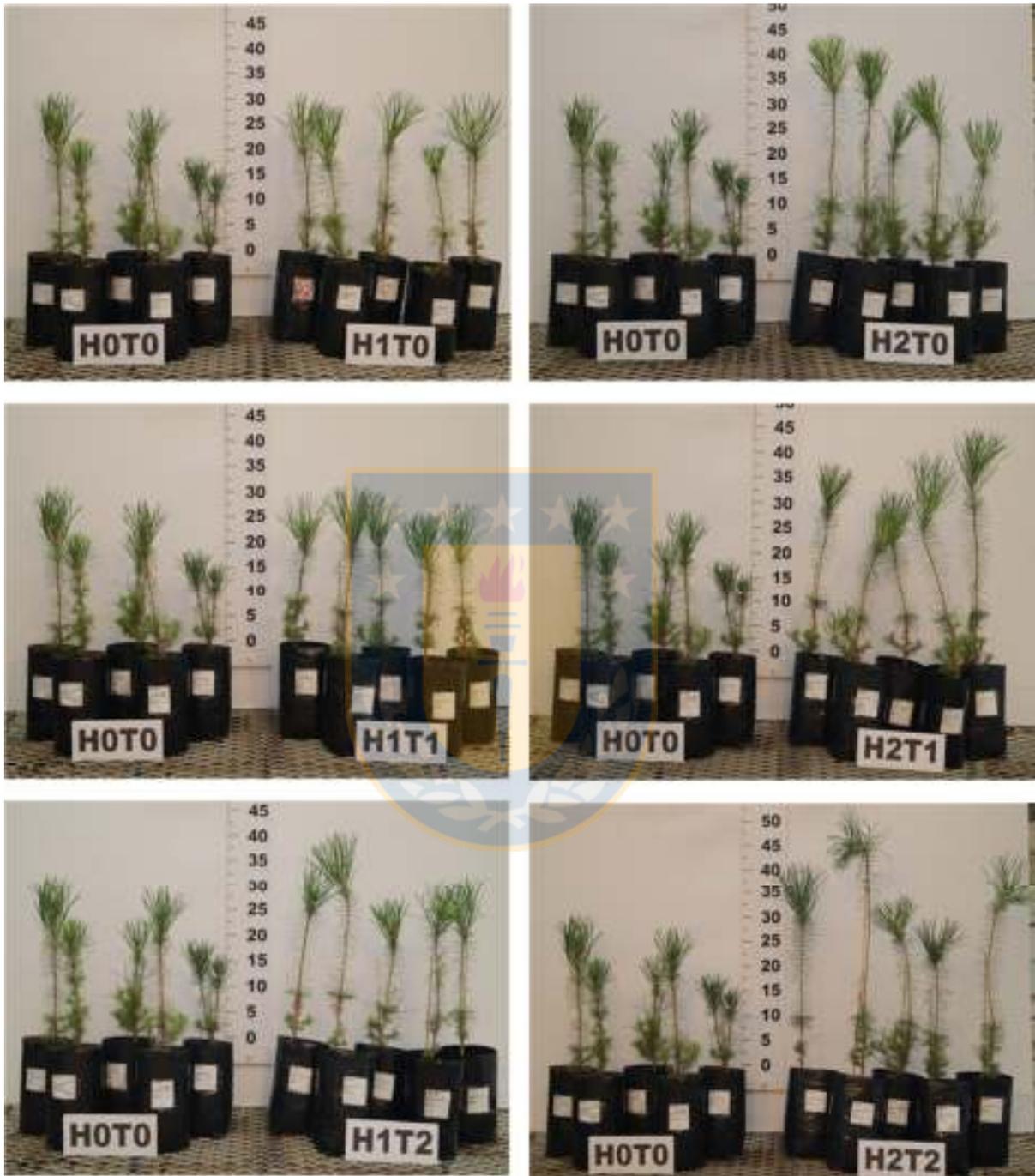


Figura 6.6 Plantas de *Pinus pinaster* inoculadas y no inoculadas con esporas de los hongos ectomicorrícicos *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2) sometidas a tres tratamiento de disponibilidad del suelo de cultivo T0 (disponibilidad hídrica alta, -0.03 MPa), T1 (disponibilidad hídrica media, -1.0 MPa) y T2 (disponibilidad hídrica baja, -1.5 MPa). Fuente: Elaboración propia.

La respuesta en el potencial hídrico prealba (Ψ_{pd}) de las plantas en el tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta) no presentó diferencias significativa observándose potenciales más cercanos a 0.0 MPa durante todo el estudio, indistintamente de la especie de HECM probado (Figura 6.4 b y Figura 6.7 a, d, g, j). El tratamiento T2 registró una disminución del potencial prealba como consecuencia de una mayor limitación hídrica del suelo de cultivo y por lo tanto estableció diferencias significativas entre los valores medios alcanzados entre los tratamientos aplicados ($P<0.05$), el menor promedio para este tratamiento se observó en plantas inoculadas con *S. luteus*, seguido por el promedio de plantas no inoculadas (H0) y por último el promedio de plantas inoculadas con *R. luteolus* (Figura 6.4b).

Al igual que las plantas de *P. canariensis*, las plantas de *P. pinaster* presentaron diferencias significativas en el valor promedio de la variable ALT ($P<0.05$), siendo de igual forma, las plantas inoculadas con esporas de *S. luteus* las que mayor valor medio para esta variable presentaron (H2T0, H2T1, H2T2) (Figura 6.6), en contraste con las plantas no inoculadas (H0T0) y plantas inoculadas con esporas de *R. luteolus* (H1T0, H1T1, H1T2) (Figura 6.5 a y Figura 6.6). A diferencia de las plantas de *P. canariensis*, sí fue posible observar diferencias significativas en el diámetro al cuello de la raíz (DAC) ($P<0.05$) (Figura 6.5b), siendo las plantas inoculadas con *S. luteus* las que presentaron el mayor promedio para esta variable, seguido del promedio de las plantas no inoculadas e inoculadas esporas de con *R. luteolus*. Un comportamiento similar ocurrió para el PSA, observándose diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *S. luteus* en comparación con las plantas no inoculadas y las inoculadas con *R. luteolus* ($P<0.05$) (Figura 6.5c).

Al relacionar el potencial hídrico prealba (Ψ_{pd}) vs. A_N , g_s , WUE y LMA para plantas de ambas especies de pino pertenecientes a los tres diferentes tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2) (Figura 6.7), se observó una progresiva disminución de los valores medios del potencial hídrico conforme se limitó la cantidad de agua. Del tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta) al T2 (disponibilidad hídrica baja) las diferencias en las tasas de A_N (Figura 6.7 a,b,c), g_s (Figura 6.7 d, e, f) y en el LMA (Figura 6.7 j, k, l) entre plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* se hicieron paulatinamente más notorias. Sólo en plantas de *P. canariensis* el comportamiento del EUA fue mayor que en plantas de *P. pinaster* (Figura 6.7

g, h, i). Las pequeñas diferencias observadas en tratamiento T0, en los tratamientos T1 y T2, de disponibilidad hídrica media y baja, respectivamente, fueron más notorias, observándose la agrupación de datos por especie que denotó de forma clara la respuesta de las variables por cada especie de pino utilizada en respuesta a la disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (Figura 6.7).

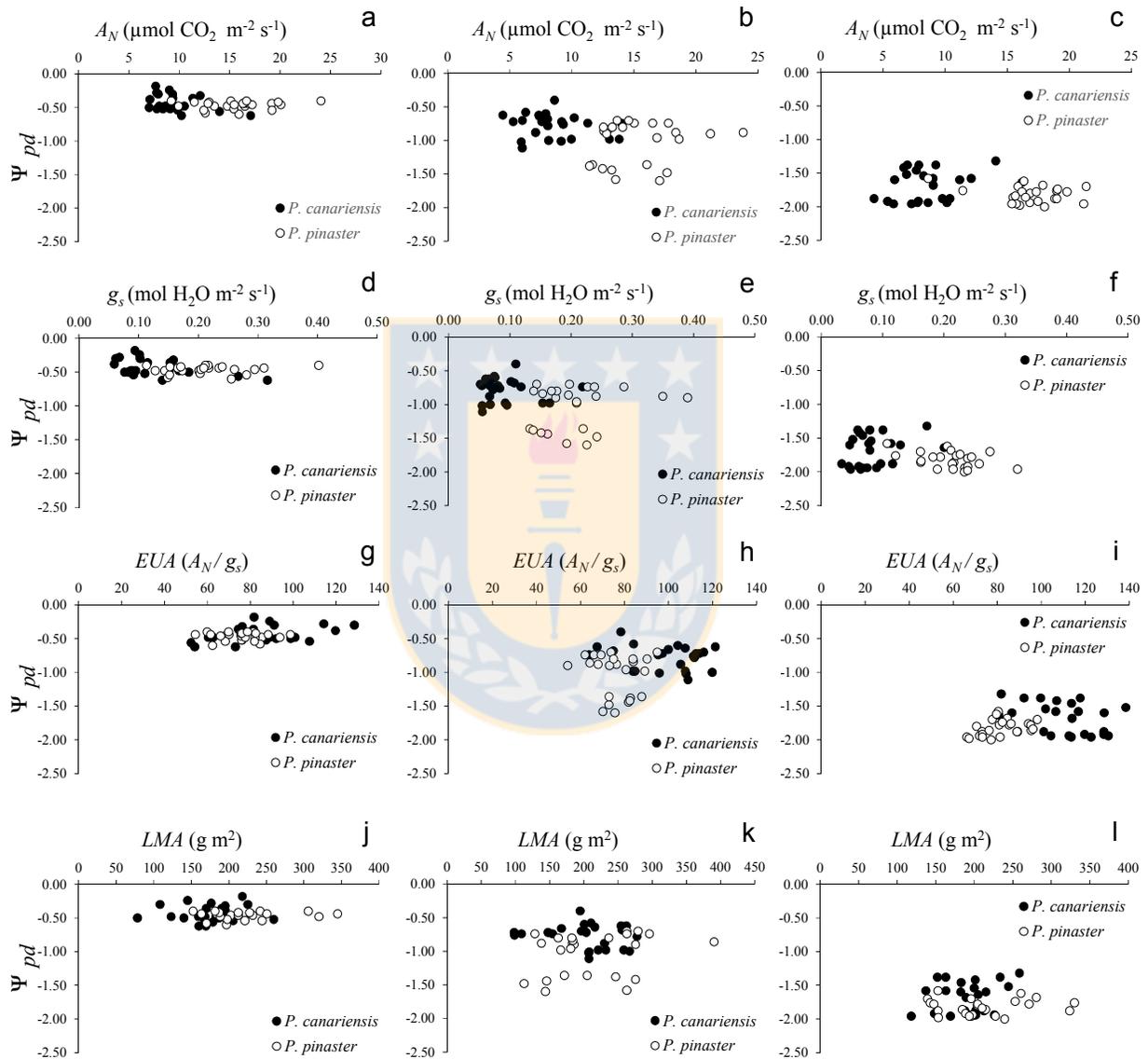


Figura 6.7 potencial hídrico prealba (ψ_{pd}) y tasa de fotosíntesis (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (a, b y c); conductancia estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (d, e y f); eficiencia del uso de agua (EUA , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) (g, h, i) y masa foliar por unidad de área (LMA , g cm^{-2}) (j, k y l) en plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster*. Fuente: Elaboración propia.

De igual forma, los tratamientos de disponibilidad hídrica fueron diferentes estadísticamente para el PSA de plantas de *P. pinaster* ($P < 0.05$), siendo las plantas del tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta) las que mostraron el mayor promedio de PSA en comparación con las plantas del tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) (Figura 6.8 a). Durante la aplicación de los tratamientos, no se presentó mortandad de plantas atribuida a la disponibilidad hídrica del suelo de cultivo, aunque visualmente pudo apreciarse cierto detrimento en la coloración del follaje de las plantas en el tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja). No obstante, se asumió que el nivel de estrés hídrico alcanzado por las plantas de esta especie de pino fue sólo medio alto.

Al contrario de la respuesta observada en la variable potencial hídrico prealba (Ψ_{pd}) de las plantas de *P. canariensis*, en plantas de *P. pinaster* sólo existieron diferencias significativas a nivel de tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo ($P < 0.05$). Esto supone la existencia de las diferencias entre el porcentaje de agua del suelo de cultivo puesto a disposición para las plantas de esta especie, siendo el tratamiento de menor disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T2) el que registró una mayor disminución del potencial prealba como consecuencia de la limitación hídrica del suelo de cultivo y así establecer diferencias significativas entre los valores medios alcanzados entre los tratamientos aplicados ($P < 0.05$). Al igual que para plantas de *P. canariensis*, las plantas de *P. pinaster* del tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta) no presentaron diferencias significativa observándose potenciales cercanos a 0.0 MPa durante todo el estudio, indistintamente de la especie de HECM inoculado (Figura 6.8 b y Figura 6.7 a, d, g, j).

Aunque los efectos de la micorrización de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* a través de esporas de las dos especies de HECM probadas no sean totalmente claros, y al parecer no hayan tenido un efecto capaz de provocar diferencias significativas en el Ψ_{pd} (aliviar el estrés aumentando el potencial hídrico), la carencia de diferencias significativas entre los tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2), puede indicar el efecto positivo a nivel de especie de HECM y de cómo estos hongos pueden contribuir a mantener potenciales hídricos similares entre el tratamiento de muy baja disponibilidad hídrica (T2), el de disponibilidad hídrica media (T1) y el tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta).

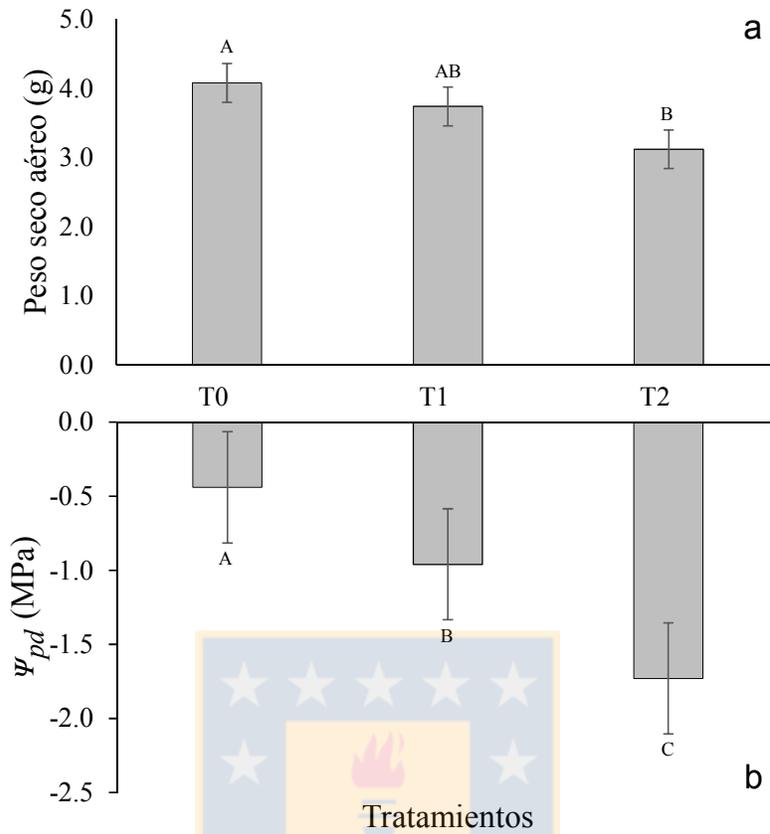


Figura 6.8 Peso seco aéreo (a) y potencial hídrico prealba (b) en plantas de *P. pinaster* no micorrizadas (H0) y micorrizadas con esporas de los HECM *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2) en respuesta a tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey ($P < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Las interacciones significativas hongo por tratamiento de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo en plantas de *P. pinaster* fueron para las variables porcentaje de micorrización (PM) y tasa de fotosíntesis (A_N) ($P < 0.05$) (Figura 6.9 a y b). Al igual que en plantas de *P. canariensis*, por haber utilizado suelo de arenales sin esterilizar como sustrato de cultivo existió colonización ectomicorrícica en las plantas de *P. pinaster* pertenecientes al tratamiento H0 (sin inocular), aunque estos porcentajes de colonización fueron muy bajos menores al 16%. Las plantas de *P. pinaster* en general, tuvieron valores medios de PM mayores al 50% cuando fueron inoculados de forma controlada con suspensiones esporales de *R. luteolus* y *S. luteus*. Durante

las evaluaciones, se observó que ambas especies de HECM produjeron gran cantidad de micelio y rizomorfos creciendo a través del suelo a los 24 meses de cultivo.

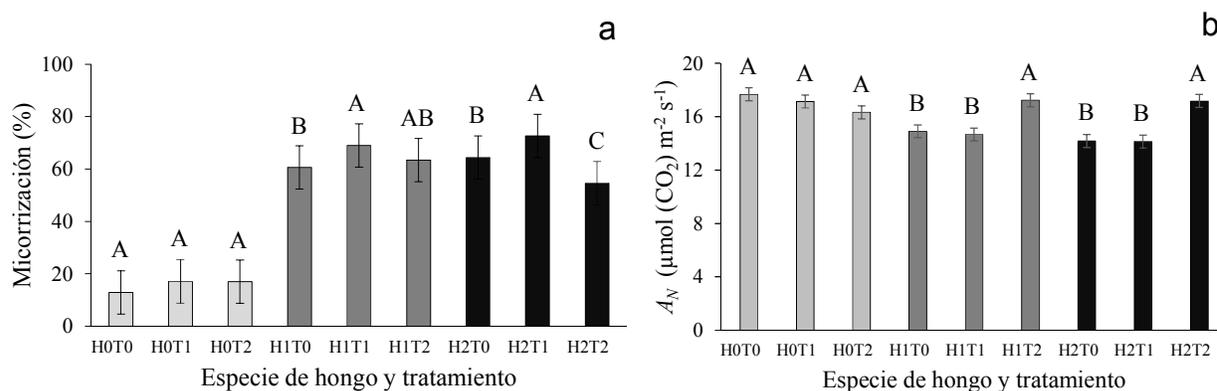


Figura 6.9 Porcentaje de micorrización (a) y tasa de fotosíntesis (b) en plantas de *P. pinaster* no micorrizadas (H0) y micorrizadas con esporas de los HECM *R. luteolus* (H1) y *S. luteus* (H2) y su interacción con tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo (T0, T1 y T2). Letras diferentes indican diferencias significativas Tukey ($P < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Para plantas de *P. pinaster* inoculadas con *R. luteolus* los mayores valores medios del PM se produjeron en el tratamiento T1 (69.02%) ($P < 0.05$) de disponibilidad hídrica media del suelo de cultivo en comparación con las plantas del T0 (de menor disponibilidad hídrica) inoculadas con la misma especie de HECM. Para plantas de esta misma especies inoculadas con *S. luteus* los mayores valores medios de PM se presentaron en el tratamientos T1 (disponibilidad hídrica media) y seguidas por el PM de plantas pertenecientes al tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta) y el promedio menor para esta variable en el tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) ($P < 0.05$) (Figura 6.9 a). La tasa de fotosíntesis (A_N) de las plantas no micorrizadas de *P. pinaster* en el tratamiento T0 (riego a capacidad de campo) no presentó diferencias significativas. De igual forma, no fue posible observar diferencias estadísticas entre la A_N resultantes de los tratamientos T0 y T1 en plantas inoculadas con ambas especies de HECM. Por el contrario y de manera coincidente, las plantas del tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) presentaron

diferencias estadísticas cuando fueron inoculadas con suspensiones esporales de *R. luteolus* y *S. luteus* (Figura 6.9 b).

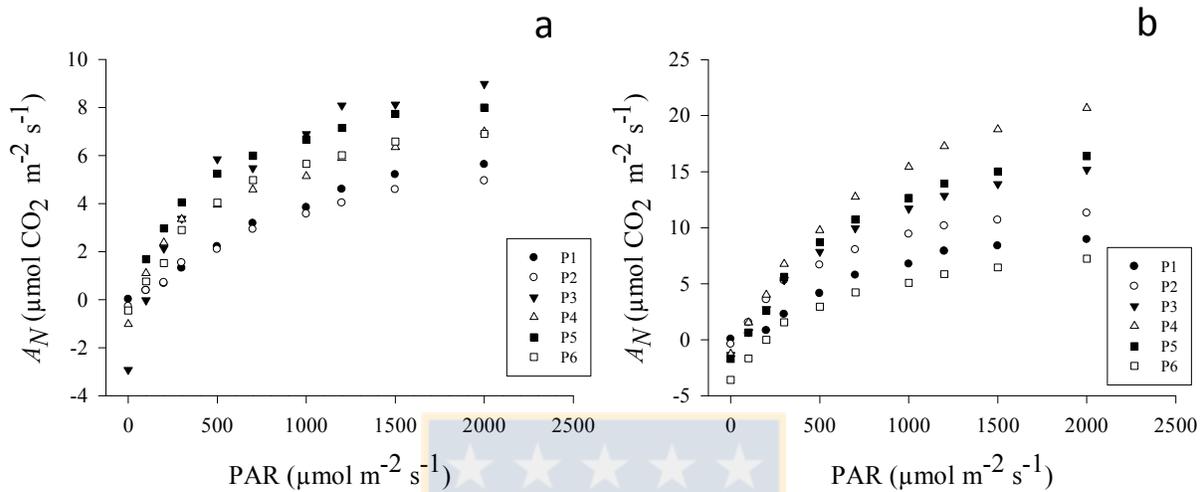


Figura 6.10 Curva de asimilación de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de plantas de *Pinus canariensis* (a) y *P. pinaster* (b) de 24 meses de edad a diferentes valores de PAR. Tomadas de seis plantas por especie, dos plantas por tratamiento de disponibilidad hídrica para plantas inoculadas y no inoculadas con los hongos ectomicorrícicos *R. luteolus* y *S. luteus* por separado. Fuente: Elaboración propia.

Al obtener las respectivas curvas de luz por especie, se observó que las dos especies de pino utilizadas presentan diferencias en los niveles de A_N , siendo las plantas de *P. canariensis* las que presentan en general tasas de A_N menores a las de las plantas de *P. pinaster* (Figura 6.10 a y b). En contraste con las plantas de *P. canariensis*, las diferencias de la A_N entre plantas de *P. pinaster* pertenecientes a los tres diferentes tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo fueron mayores resultando en diferencias significativas a nivel de interacción especie de hongo y tratamiento (Figura 6.10 b).

Para los componentes fisiológicos que comprenden la eficiencia del uso del agua, tanto plantas de *P. canariensis* como de *P. pinaster* presentaron líneas de ajuste con pendiente negativa

diferentes en la relación entre las tasas de fotosíntesis A_N y EUA (Figura 6.11a; $R^2 = 0.31$ y 0.07 para ambas especies de pino respectivamente), aunque las plantas de *P. pinaster* mostraron un rango más amplio de valores de A_N . Del mismo modo, las dos especies de pino tuvieron una relación negativa similar entre la g_s y el EUA (Figura 6.11b; $R^2 = 0.62$ y 0.48 para ambas especies de pino respectivamente).

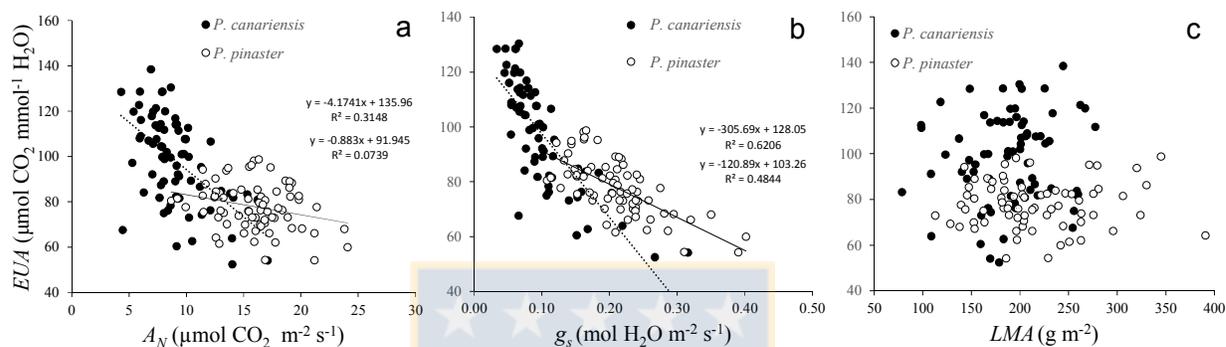


Figura 6.11 Eficiencia del uso de agua (WUE , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) vs. (a) tasa de fotosíntesis (A_N ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para *P. canariensis* ($y = -4.1741x + 135.96$; $R^2 = 0.31$) y *P. pinaster* ($y = -0.883x + 91.945$; $R^2 = 0.07$), (b) conductancia estomática (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para *P. canariensis* ($y = -305.69x + 128.05$; $R^2 = 0.62$) y *P. pinaster* ($y = -120.89x + 103.26$; $R^2 = 0.48$), y (c) masa foliar por unidad de área (LMA ; g cm^{-2}) para las dos especies de pino. Líneas de puntos *P. canariensis* y líneas continuas para *P. pinaster*. Fuente: Elaboración propia.

Las plantas de *P. canariensis* tenían tasas de transpiración más bajas en comparación con las plantas de *P. pinaster*, pero presentaron un EUA más alto lo que originó diferencias significativas entre tratamientos de disponibilidad hídrica para esta variable analizada en plantas de esta especie de pino ($P < 0.05$). En contraste con plantas de *P. canariensis* en las cuales no se observaron diferencias significativas en el EUA ni entre especies de HECM ni entre tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo. Las plantas de *P. canariensis* presentaron menores tasas de g_s , pero mayor LMA comportamiento contrario al observado en plantas de *P. pinaster* con mayor g_s y menor LMA (Figura 6.11c).

Discusión

En este estudio se describe como plantas micorrizadas y no micorrizadas de *Pinus canariensis* y *P. pinaster*, especies simbiotes obligadas y también consideradas de clima mediterráneo por poseer tolerancia de media a alta a condiciones limitantes de agua del suelo, al ser sometidas a tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo presentaron respuestas diferenciadas en los parámetros morfofisiológicos analizados. Resultaron desde no efectos, efectos por factor (hongo o tratamiento) y efectos de interacción del hongo por tratamiento de disponibilidad hídrica aplicado (Anexo 1). La inoculación con suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* produjeron en los sistemas radicales de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* (24 meses de edad) porcentajes de colonización micorrícica (PM) mayores al 60% considerados de nivel alto de acuerdo con Tateishi *et al.* (2003). En contraste, trabajos como el de Ortega *et al.* (2004) reportan PM del 30% en las raíces de plantas de *P. radiata* inoculadas con los HECM *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum*. Para Duñabeitia *et al.* (2004) la colonización micorrícica y el crecimiento de las plantas variaron de acuerdo con las especies de hongos y de las condiciones de crecimiento de las plantas. El PM en raíces de plantas colonizadas con *S. citrinum* fue del 50%, pero para *R. luteolus* y *R. roseolus* fueron del 80%. Por su parte, Domínguez-Núñez *et al.* (2004) al inocular plantas de *P. halepensis* con suspensiones esporales de *Tuber melanosporum* obtuvieron promedios de PM iniciales del 20% y cercanos al 30% al final de su ensayo, obteniendo para todos los parámetros una mejora significativa en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas dos meses después de la inoculación.

En el presente estudio las plantas de *P. canariensis* inoculadas con *S. luteus* fueron más altas, presentaron mayor peso seco aéreo y mayor robustez. De igual forma, las plantas de *P. pinaster* al ser inoculadas con la misma especie de HECM fueron más altas, pero además tuvieron mayor DAC y PSA, en comparación con las plantas inoculadas con *R. luteolus* y que las plantas no inoculadas. No obstante, Lazarevic *et al.* (2012) al inocular plantas de *P. nigra* con esporas de *S. granulatus*, al final de la primera estación de cultivo observaron buen desarrollo de ectomicorrizas en los sistemas de raíces, pero el crecimiento de las plantas fue menor. Duñabeitia *et al.* (2004), de igual forma encuentran que las plantas de *P. radiata* inoculadas con *R. roseolus* y *S. citrinum* fueron más altas y con mayor peso seco que las

plántulas del control, pero las diferencias significativas sólo fueron para plantas inoculadas con *R. roseolus*. Kipfer *et al.* (2012), encontraron que en específico la presencia de *Suillus granulatus*, aumentó considerablemente la biomasa aérea de las plántulas de *Pinus sylvestris* en comparación con las plantas no micorrizas. Por el contrario, *Cenococcum geophilum*, *Paxillus involutus* y *Rhizopogon roseolus* no tuvieron ningún efecto sobre la biomasa de los brotes. *S. granulatus* parece acceder a los recursos limitantes del crecimiento de la planta a los cuales los otros tres HECM no, o bien son incapaces de transferirlos los fitobiontes. Estas respuestas diferenciales entre especies confirma el hecho de que los HECM no siempre actúan como mutualistas, sino que pueden actuar como mutualistas o parásitos, según el genotipo de la especie fúngica o del entorno biótico y abiótico (Johnson *et al.* 1997, Jones y Smith 2004).

En resultados previos del presente trabajo *in vitro*, *R. luteolus* mostró un crecimiento notable bajo diferentes condiciones de cultivo, y en trabajos de inoculación demostró excelente capacidad de colonización. Pereira *et al.* (2007) mencionan que *R. luteolus* es un HECM que crece asociado con especies de pino, particularmente en los suelos arenosos de la Región del Bío-Bío en Chile, el mismo tipo de suelo de cultivo utilizado en el presente estudio. Otros trabajos han demostrado que *R. luteolus* mejora el rendimiento y el establecimiento de la planta bajo estrés hídrico (Theodorou y Bowen 1970, Theodorou 1971, Castellano 1996, Steinfeld *et al.* 2003). *R. roseolus* perteneciente al mismo género, fue la más efectiva de otras dos especies, más adaptable y mostró el mayor rango de tolerancia a condiciones ambientales adversas en cultivo puro. Al igual que *R. luteolus* (García-Rodríguez *et al.* 2017) *R. roseolus* se propone como una especie fúngica prometedora para la inoculación con ECM de *P. radiata* en el vivero (Duñabeitia *et al.* 2004). No obstante, en el presente trabajo fue *S. luteus* la especie que mejoró el comportamiento de mayor número de parámetros morfológicos de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster*. Al igual que en estudios como el de Boyle y Hellenbrand (1991) en plantas de *Picea mariana*, en el presente estudio *S. luteus* y *R. luteolus* tuvieron la capacidad para formar abundantes rizomorfos que se extienden profusamente a través del suelo de cultivo. Al igual que para estos autores, esta característica especialmente para *S. luteus*, pudo influir positivamente en el peso seco de raíces nuevas (PSRN) en plantas de *P. canariensis*. Bajo las condiciones

experimentales utilizadas en este estudio, el rendimiento de las plantas *P. pinaster* no se vio afectado independientemente del estado micorrícico.

El estrés hídrico suele utilizarse como práctica de cultivo en algunos viveros forestales. Levitt (1980) menciona que es posible aumentar la resistencia de las plantas a un estrés determinado (resistencia adquirida) sometiéndolas a dosis subletales de ese estrés (endurecimiento). El endurecimiento de la planta en viveros forestales es una práctica de cultivo en la que se limita la disponibilidad hídrica y se reducen los niveles de fertilización (Villar-Salvador *et al.* 1999, Villar-Salvador *et al.* 2004). Este tipo de endurecimiento tiene la finalidad de someter al cultivo a un determinado grado de sequía que detenga el crecimiento de las plantas y active sus mecanismos de resistencia a condiciones de déficit hídrico. Aunque no todas las especies muestran variaciones sobre los mismos caracteres ni la intensidad de variación es la misma (Vilagrosa *et al.*, 2003). Trabajos previos mencionan que los niveles medios o moderados de estrés hídrico suelen provocar mayor nivel de endurecimiento, en comparación con los intensos o los suaves (Villar-Salvador *et al.* 1999, Villar-Salvador *et al.* 2004). Se han reportados niveles de potencial hídrico prealba para un adecuado endurecimiento sin producir daños a la planta de -1.2 a -1.8 MPa en plantas de *Pinus halepensis* y de -1.0 a -1.4 MPa en plantas de *P. pinea* (Vilagrosa *et al.* 2006). En algunos estudios se concluye que el endurecimiento por sequía, especialmente de intensidad moderada, aumenta la tolerancia a la sequía de las plántulas de encina (Villar-Salvador *et al.* 2004). Sin embargo, es más común que el riego se utilice para mantener el potencial hídrico de la planta por encima de 0.5 MPa, esto para mantener un nivel de humedad adecuado y evitar limitaciones del crecimiento (Landis *et al.* 1989, Prieto-Ruiz *et al.* 2004). El riego afecta principalmente al mantenimiento de la turgencia que impulsa la ampliación de la célula (Johnson 1986).

En el presente estudio el PSA de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* fue mayor en el tratamiento T0 (disponibilidad hídrica alta), conforme el potencial hídrico disminuye también lo hace el PSA de las plantas. En su estudio, Ávila-Flores *et al.* (2014) encontraron una tendencia similar en plantas de *P. engelmannii* sometidas a tres diferentes niveles de riego (48, 96 y 192 h). Las plantas regadas cada 48 h fueron más altas, con mayor DAC, con mayor biomasa seca aérea y radical en comparación con las plantas regadas cada 96 y 192 h. Para ellos, el estrés

hídrico provocado con el riego cada 192 h tendió a ser extremo provocando que las variables las variables morfológicas analizadas tuvieran valores significativamente menores con respecto al riego cada 48 h. Valladares y Sánchez (2006) encontraron, hacia el final del verano, que las plántulas de varias especies expuestas a estrés hídrico eran significativamente más pequeñas en comparación con las plantas del control en todas las especies excepto en *Viburnum tinus*, *Pinus sylvestris* y *P. pinaster* que exhibieron plantas pequeñas en el tratamiento de estrés hídrico y en las del control. Este crecimiento limitado se observó desde el diámetro del tallo hasta el área foliar total y la masa seca de la planta. En este y otros estudios, el menor crecimiento de las plantas al reducir el suministro de agua o espaciar los riegos produce déficit hídrico en las plantas, generando un balance hídrico negativo, reduciendo la turgencia (inhibición de la elongación celular), disminuye el crecimiento aéreo, altera la concentración de solutos orgánicos, modifica la actividad metabólica celular y el aporte de azúcares de la fotosíntesis (Hsiao 1973, Davis y Jacobs 2005).

En algunos estudios, no obstante haber presentado efectos positivos o neutros sobre algunos parámetros, se atribuye a la micorrización el reducir el tamaño de la planta (altura y peso seco). El movimiento del carbono de la planta hacia los hongos podría explicar este efecto; esto porque los HECM obtienen su carbono principalmente de su fitobionte (Read 1987, Harris-Valle et al., 2009) ocasionando una mayor demanda de carbono en las raíces micorrizadas en comparación con las raíces no infectadas (Paul et al., 1985, Harris-Valle et al. 2009). La exportación de carbono a las micorrizas se observaron en *Rhizopogon vinicolor* infectando otras especies de Pinaceae (Dosskey et al. 1990). La inoculación micorrícica también puede causar una mayor transpiración (Pallardy et al. 1995) y, por lo tanto, reducir el potencial hídrico foliar, lo que aumenta las limitaciones estomáticas para la ganancia de carbono (Atala et al. 2012). Por lo tanto, los efectos de la micorrización sobre el crecimiento de las planta micorrizadas pueden depender del equilibrio entre el consumo de carbohidratos del hongo y los beneficios obtenidos por el fitobionte. Variaciones en este equilibrio puede reducir, en lugar de aumentar el crecimiento de la planta. Las especies fúngicas, el grado de formación de micorrizas y el crecimiento micelial son importantes para este equilibrio (Dosskey et al. 1990, Stenström y Ek 1990, Colpaert et al. 1992).

El peso seco de nuevas raíces (PSNR) en plantas de *P. canariensis* inoculadas con el HECM *S. luteus* fue mayor en el tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) en comparación con los PSNR resultantes en los tratamientos T1 y T0 (disponibilidad hídrica media y baja, respectivamente). Salle *et al.* (2008), mencionan que la inducción del estrés hídrico estimula el crecimiento de la raíz y favorece la absorción de agua, siempre y cuando la parte aérea tenga una tasa de fotosíntesis adecuada. Pudo ser éste el caso en el presente estudio, ya que los niveles de A_N fueron adecuados, aunque no se observaron diferencias significativas en ninguna fuente de variación (hongo, nivel de disponibilidad hídrica o en la interacción entre ellos). Otros autores señalan que el estrés hídrico, en la etapa final de cultivo, puede incrementar el potencial de formación de nuevas raíces, por lo general esto se ha relacionado con una mayor supervivencia y crecimiento de las plantas en los sitios de plantación (Cochard *et al.* 2009, Hölttä *et al.* 2011, Candel-Pérez *et al.* 2012). En el presente estudio las *P. canariensis* mostraron potenciales hídricos promedios de -0.4, -0.8 y -1.68 (T0, T1 y T2, respectivamente), aunque sólo existieron diferencias significativas a nivel de tratamiento de disponibilidad hídrica en plantas de *P. pinaster* con promedios de potencial hídrico de -0.44, -0.96 y -1.73 (T0, T1 y T2, respectivamente). Al respecto diversos autores consideran que una planta no presenta déficit de agua, si su potencial hídrico (Ψ_{pd}) es superior a -0.05 MPa, presenta un estrés moderado cuando su Ψ_{pd} oscila entre -0.05 y -1.0 MPa; estrés intermedio si sus valores de potencial varían entre -1.1 a -1.4 y cuando el Ψ_{pd} es menor a -1.5 MPa, se puede considerar que el estrés hídrico es severo y por ello, limita el crecimiento de las plántulas (Lopushinsky y Max 1990, Cleary *et al.* 2006, Prieto-Ruíz *et al.* 2012). De acuerdo a lo anterior, en el presente estudio las plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster*, a diferencia de lo que inicialmente se sugirió, estuvieron sometidas a niveles de estrés hídrico de moderado a severo. A pesar de esto y en función de la especie de pino, no existió efecto de la inoculación y tratamiento de disponibilidad hídrica sobre todas las variables morfofisiológicas analizadas. Lo anterior supone una elevada capacidad de ajuste osmótico de las plantas de ambas especies de pino utilizadas a las condiciones del estrés hídrico impuesto, independientemente de la especie de HECM inoculada.

La interacción especie de hongo y tratamiento para ambas especies de pino utilizadas, en este estudio en las plantas de *P. canariensis* inoculadas con *S. luteus* el PM aumentó conforme el potencial hídrico disminuyó, siendo el tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) el que

coincidió con el mayor valor de PM. Sin embargo, para plantas inoculadas con *R. luteolus* los mayores valores de PM en los tratamientos de menor disponibilidad hídrica (T0 y T1 de disponibilidad hídrica alta y media, respectivamente). El aumento del PM en función de la disminución de la disponibilidad hídrica fue una tendencia también observada en plantas de *P. pinaster* inoculadas con *R. luteolus* y *S. luteus* siendo el tratamiento T1 en el que existió el mayor PM, reduciéndose el PM en el tratamiento T2, pero las diferencias significativas existentes entre el T1 y T2 fueron sólo para *S. luteus*. Las coníferas presentan en general estrategias evitadoras del estrés hídrico (cierran los estomas y aumentan el crecimiento de raíces en relación con los brotes) (Levitt 1980, Pardos *et al.* 2015). *P. canariensis* en particular es catalogado como una de estas especies presentando un comportamiento isohídrico, o ahorrador de agua (Morales *et al.* 1999), se menciona posee un alto control estomático que exhibe en situaciones de estrés hídrico manteniendo alto su potencial hídrico (Morales *et al.* 1999, Peters *et al.* 2003). *P. halepensis* basa también su estrategia de supervivencia en evitar la sequía a través del almacenamiento y un uso moderado de agua (Oliet *et al.* 2002). Pero además, de esta capacidad para conservar agua, esta especie tiene la facilidad de extender rápidamente sus raíces hacia nuevos volúmenes de suelo (Gozalo *et al.* 1998). Villar-Salvador (1998), menciona que las plantas de esta especie comienzan a morir a partir de potenciales hídricos menores a -2.8 MPa.

Resultados de Valladares y Sánchez (2006) en plantas de *P. sylvestris* y *P. pinaster* (sometidas a un tratamiento control (-0.5 MPa) y de estrés hídrico (-4.5 MPa) muestran que fueron relativamente tolerantes al estrés hídrico, mientras que plantas del género *Quercus* exhibieron un amplio rango de supervivencia bajo estrés hídrico. Otros estudios han informado resultados contradictorios con respecto a la capacidad de las asociaciones de micorrizas para neutralizar los efectos de la limitación del agua sobre el crecimiento del árbol. Estudios iniciales mostraron un menor potencial hídrico en plántulas ectomicorrizadas de *P. ratiata* bajo estrés hídrico en comparación con las plántulas no micorrizadas (Sands y Theodorou 1978). En estudios como el de Navarro-García *et al.* (2011), la colonización micorrícica de *P. tinctorius* en plantas de *Arbutus unedo* L. fue hasta del 34%, pero esto no influyó en el efecto de la sequía ni en la interacción entre la sequía y la inoculación micorrícica. Además, en el tratamiento de déficit de agua aumentó significativamente el peso seco de la raíz. En otros trabajos encontraron, que la

supervivencia de la plántula de *P. radiata* expuesta a la sequía aumentó con la inoculación previa con *R. luteolus*. Esta mayor tolerancia a la sequía debido a la inoculación de micorrícica ha sido reportada previamente en otras especies de plantas (Steinfeld *et al.* 2003, Ortega *et al.* 2004).

Los efectos de la micorrización controlada, los tratamientos de disponibilidad hídrica y la interacción de ellos no fueron significativos en la A_N de plantas de *P. canariensis*. No obstante, en plantas de *P. pinaster* la tasa de A_N fue mayor en el tratamiento de menor disponibilidad hídrica (T0) al ser inoculadas con suspensiones esporales de *R. luteolus* y *S. luteus*. En estudios como el de Ortega *et al.* (2004) en plantas de *P. radiata* de dos años, la tasa de fotosíntesis A_N de árboles inoculados con *R. roseolus* o *S. citrinum* fue más alto que el de árboles no inoculados. La tasa de fotosíntesis en plantas de *P. halepensis* fue, al mes de la inoculación con *Tuber melanosporum*, significativamente más alta en plantas inoculadas respecto a las del control (2.7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en planta inoculada frente a 1.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en el control) (Domínguez-Núñez *et al.* 2004).

En el presente estudio las tasas de g_s y asimilación neta de CO_2 para plantas micorrizadas y no micorrizadas de *P. canariensis* y *P. pinaster* sometidas a tres tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo estuvieron altamente relacionadas. Al igual que para (Escalona *et al.* 2000) en general el mejor ajuste de los datos para cada especie fue a una función hiperbólica. Las diferencias en la dispersión de los datos para plantas de cada especie se atribuyó a las diferencias entre los tratamientos (Bota *et al.* 2001). Lebourgeois *et al.* (1998) sometieron plantas (2+0) de dos variedades de *P. nigra* (Calabrian pine y Corsican pine) especie de pino mediterránea a dos tratamientos de riego contrastante (capacidad de campo y sequía). El tratamiento de sequía simuló las condiciones de campo durante un verano prolongado sin lluvia. La tasa de fotosíntesis (A) disminuyó después de la g_s , cuando esta última disminuyó aproximadamente el 50% del valor inicial (debajo de 30 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para ambas variedades, la tasa de g_s y A se estabilizaron a valores mínimos de 11 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.0011 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 0.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ después de 43 días de sequía. Al respecto Flexas y Medrano (2002), mencionan que bajo estrés hídrico, los estomas reducen su grado de apertura para evitar la desecación bajo condiciones de sequía. Posteriormente, la fotosíntesis se ve afectada por la deficiencia interna

de agua. La fotosíntesis neta se reduce inevitablemente debido a la limitada disponibilidad de CO₂ a nivel de cloroplastos (Yang y Li 2016).

En este estudio se tomaron mediciones puntuales al final del ensayo, por lo tanto, no se observó la evolución de estas variables a través del tiempo de duración del ensayo. Los menores promedios de g_s y A_N para *P. canariensis* y *P. pinaster* (0.066, 7.52) y A_N (0.183, 14.14) en el presente estudio no fueron tan bajos en plantas inoculadas, no inoculadas y en todos los tratamientos. Las dos especies mostraron similar tendencia en las tasas de ambas variables en respuesta a la disminución del potencial hídrico. Los resultados de este estudio son consistentes con estudios que muestran que la g_s son mayores en plantas micorrizadas que en plantas no micorrizadas sometidas ambas a sequía, como consecuencia de una mayor absorción de agua (Augé *et al.* 1987, Subramanian *et al.* 1995, Duan *et al.* 1996), lo que permite el mantenimiento de mayores tasas de fotosíntesis y mayores contenidos de agua en las plantas con micorrizas (Morte *et al.* 2001). Sin embargo, por lo general potenciales hídricos bajos indican baja actividad fisiológica (Fleming *et al.* 1996, Kavanagh y Zaerr 1997), altos niveles del potencial hídrico prealba en especies como *P. halepensis* se relacionan con una baja tasa de asimilación neta (0.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para un potencial hídrico $\Psi_x = -1.6 \text{ MPa}$) (Melzack *et al.* 1985).

Con respecto a la eficiencia del uso del agua (*EUA*), únicamente las plantas de *P. canariensis* presentaron diferencias significativas en función de los tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo. Aunque no fueron estadísticamente diferentes en general las plantas de *P. canariensis* inoculadas presentaron valores promedio de *EUA* mayores que las plantas sin inocular. Sin embargo, Duñabeitia *et al.* (2004) obtuvieron valores de *EUA* más altos para plantas de *P. radiata* colonizadas con *R. luteolus*, *R. roseolus* y *S. citrinum* que en las plantas no inoculadas, sugiriendo que existió un acoplamiento adecuado entre la tasa de asimilación de CO₂ y la conductancia estomática. Asimismo, Guehl y Garbaye (1990) y Guehl *et al.* (1990) sugirieron que la mejoría en la *EUA* está relacionada también con un efecto nutricional, en especial con una mejor absorción de P (fósforo) debida a la colonización micorrízica, lo que tendría una influencia en la asimilación de CO₂ así como en la g_s de plántulas colonizadas. Se considera que la *EUA* es uno de los principales factores que determina el crecimiento en condiciones de baja disponibilidad hídrica (Guehl y Aussenac 1987), Por su parte, Duñabeitia

et al. (2004) sugieren que la colonización de ECM con *R. roseolus* puede favorecer la adaptación de las plantas hospedantes a condiciones de sequía mejorando la captación de agua. Las plantas de *P. canariensis* que pertenecieron al tratamiento T0 (disponibilidad hídrica baja) fue el que presentó los mayores valores de *EUA*. También, fue uno de los tratamientos en el que se presentaron menores tasas de g_s ; no obstante, que no existieron diferencias significativas, esto indicaría además que su tasa de transpiración y por consecuencia su tasa de asimilación de CO_2 fue reducida. Lo anterior indica que las plantas de *P. canariensis* poseen mayor tolerancia a la sequía.

La tolerancia a la sequía está generalmente asociada con un uso eficiente del agua (Ferrio *et al.* 2003), pero se han encontrado resultados contrastantes con respecto a la *EUA* bajo condiciones de estrés hídrico en ecosistemas mediterráneos (Reichstein *et al.* 2002). Lo anterior es consistentemente con Flexas y Medrano (2002) y Galmés *et al.* (2007) quienes mencionan que la mejora en la *EUA* bajo la sequía se logra mediante una abertura estomática reducida para una tasa de asimilación de carbono determinada, y que se sabe ocurre como resultado del proceso de adaptación y aclimatación. Renninger *et al.* (2015), basándose en datos instantáneos de intercambio de gases encontraron que las especies de pino tienen una *EUA* significativamente mayor que algunas especies de encinos. Estos mismos autores mencionan que la *EUA* describe la cantidad de agua traspirada por unidad de área foliar, para una tasa dada de asimilación fotosintética. Sin embargo, (Clark *et al.* 2014) mencionan que la *EUA* debe interpretarse en función de varios factores incluyendo las diferencias en el área foliar y el hábito foliar, por ejemplo, en especies de pino que asimilan más carbono en la primavera y el otoño, lo que ocasiona a una *EUA* menor.

Al igual que para la *EUA* sólo las plantas de *P. canariensis* presentaron diferencias significativas en la masa foliar por área (*LMA*), siendo las plantas inoculadas con *S. luteus* las que mayor valor presentaron para esta variable. Lo anterior sugiere que la inoculación de determinada especie de HECM puede tener influencia sobre el comportamiento de la *LMA* de las plantas de esta especie. Aunque no existieron diferencias significativas a nivel de tratamiento, en general los valores de *LMA* más altos existieron en los tratamientos T1 y T2, y los más bajos en el T0. De acuerdo con Aponte (2011) los rasgos foliares reflejan las estrategias de adaptación de las

especies vegetales a las condiciones ambientales y a la disponibilidad de recursos a la vez que influyen en los procesos del ecosistema. Los valores de *LMA* fueron mayores en plantas de *P. pinaster* en comparación con las plantas de *P. canariensis*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas a ningún nivel en plantas de *P. pinaster* en general la mayor *LMA* se observó cuando las plantas fueron inoculadas con *R. luteolus* y en el tratamiento T0 (de disponibilidad hídrica alta). De acuerdo con de la Riva *et al.* (2016a), las especies con alta *LMA* se encontraron en hábitats con baja disponibilidad de agua. Los valores más altos de *LMA*, como en el caso de *P. pinaster* en este estudio, se relacionan con una larga vida útil de la hoja, la retención de nutrientes y la protección contra la desecación (Mooney y Dunn 1970, de la Riva *et al.* 2016b). Por el contrario, valores más bajos de *LMA*, como en el caso de *P. canariensis* en el presente estudio, confieren una ventaja en la eficiencia de la captación de recursos, al aumentar la superficie de absorción por unidad de biomasa tisular (Reich *et al.* 1992, Wright *et al.* 2004).

En el presente estudio la *LMA* entre las plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* fue diferente, como lo mencionan Reich *et al.* (1998) la *LMA* puede variar en función de la luz y de la duración de la hoja, la *LMA* se utiliza menudo como un indicador de la variación de la estructura de la hoja. La masa foliar por área (*LMA*) es un rasgo morfológico ampliamente utilizado como un buen indicador del funcionamiento de la planta (tasa fotosintética y respiratoria, composición química etc.). La *LMA* puede dividirse en la densidad de la hoja (LD) y la relación entre el volumen foliar y el área (LVA o grosor), que a su vez están determinados por los tejidos anatómicos y la composición química (Renninger *et al.* 2015). Al simple tacto las hojas de la de *P. canariensis* fueron más abundantes, delgadas, de consistencia rugosa y glaucas de color, las hojas de *P. pinaster* fueron más grandes, pero menos, abundantes, rígidas, más gruesas y de color verde oscuro. Robakowski y Bielinis (2017), en plantas de *Abies alba* ($194 \pm 16 \text{ g m}^{-2}$ en agujas de 4 años) observaron que conforme el contenido de agua de la aguja disminuye linealmente, la *LMA* aumenta exponencialmente con la edad de la aguja. En general, el *LMA* es más alta en las coníferas en comparación con los otros grupos funcionales de plantas y aumenta con la edad de la hoja. Los rasgos fisiológicos de la hoja como la tasa neta de asimilación de CO_2 (P), la respiración oscura (Rd) y el contenido de nutrientes en la hoja están estrechamente relacionados con el *LMA* (Reich *et al.* 1998, Wright *et al.* 2004).

En el presente trabajo se comprueba, aunque parcialmente, la hipótesis que las micorrizas mejoran las relaciones hídricas y el estado nutrimental de las plantas micorrizadas (Lehto y Zwiazek 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos, el comportamiento de los diferentes parámetros morfofisiológicos analizados en las plantas de las dos especies de pino, aunque no en todos los casos, mostraron que la micorrización controlada con dos especies de HECM tuvo un efecto positivo dependiendo de las combinaciones de micobiontes y fitobiontes propuestas.

Como se ha observado en otros trabajos (Read y Boyd 1986), los resultados obtenidos sugieren que los beneficios de la colonización micorrícica, se manifestaron particularmente bajo condiciones de estrés. No obstante, el desempeño de en algunas de las variables analizadas en las plantas de las especies de pino son producto de la aclimatación del crecimiento cuando este ocurre bajo condiciones de baja disponibilidad hídrica, demostrando que estas especies de pino poseen marcada tolerancia a la sequía, que puede ser potenciada al utilizar a la micorrización controlada con especies de HECM apropiadas. Resultados como los de Ortega *et al.* (2004) indican que buenas prácticas de cultivo más programas de inoculación micorrícica compatibles aseguran que las raíces de plántulas, como las de *P. radiata*, colonizadas con hongos micorrícicos dan como resultado un crecimiento mejorado después del trasplante en campo.

Conclusiones

La inoculación con suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *R. luteolus* y *S. luteus* en las raíces de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* (24 meses de edad) produjo altos porcentajes de colonización micorrícica (PM) mayores al 60%. Así como efectos significativos y diferenciados en los parámetros analizados en función de las combinaciones elaboradas entre especies de micobiontes y fitobiontes probadas.

El PM vario en función de las especie de micobiontes y fitobiontes, siendo en general los tratamiento de disponibilidad hídrica media y baja (T1 y T2) en los que ambas especies de HECM en los cuales se produjeron los promedios más grandes de PM.

En la mayoría de los casos se observa que *S. luteus* promueve efectos positivos sobre los diferentes parámetros morfofisiológicos de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster*, y particularmente bajo condiciones de disponibilidad hídrica media y baja. Los beneficios que aporta la inoculación de *R. luteolus* sobre las variables morfofisiológicas en plantas de las dos especies de pino fueron menos frecuentes y sobre todo a niveles medios de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo impuestos.

Los tres niveles de disponibilidad hídrica impuestos promovieron un descenso del potencial hídrico prealba capaz de inducir estrés hídrico severo, provocando un ajuste del potencial osmótico de las plantas de las dos especies de pino, aunque no existió mortalidad. Esto sugiere que por sí mismas las dos especies de pino poseen los mecanismos ecofisiológicos de respuesta para afrontar eventos de limitación hídrica del suelo.

Las dos especies de pino presentaron un acoplamiento adecuado de las variables de intercambio gaseoso (g_s y A_N), pero con tasas diferentes entre especies. Las mayores tasas de A_N en plantas inoculadas con *R. luteolus* y *S. luteus* en el tratamiento T2, sugiriendo que la micorrización controlada tuvo un efecto positivo, aún en condiciones limitantes.

En general, las plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* presentaron un aumento en la *EUA* y *LMA* como suele ocurrir en todas las formas de crecimiento, especialmente, durante la aclimatación a condiciones de bajas disponibilidad hídrica, sugiriendo que las dos especies poseen tolerancia a la sequía, y que para el *LMA* en *P. canariensis* se ve particularmente favorecido por la colonización micorrícica de *S. luteus*.

Anexo 1. Parámetros morfofisiológicos significativos por fuente de variación para plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* sometidas a tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo.

Parámetros	Fuente de variación	<i>P. canariensis</i> Valor-P	<i>P. pinaster</i> Valor-P
Altura (ALT, cm)	<i>Hongo</i>	<0.0001	0.0002
	<i>Tratamiento</i>	0.1728	0.9750
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.5891	0.6929
Diámetro al cuello de la raíz (DAC, mm)	<i>Hongo</i>	-	0.0005
	<i>Tratamiento</i>	-	0.0506
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	-	0.9281
Peso seco aéreo (PSA, g)	<i>Hongo</i>	0.0142	0.0001
	<i>Tratamiento</i>	0.0115	0.0077
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.4089	0.3304
Peso seco de raíces nuevas (PSRN, g)	<i>Hongo</i>	0.4702	-
	<i>Tratamiento</i>	0.0079	-
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.0749	-
Índice de Robustez (IR)	<i>Hongo</i>	0.0016	-
	<i>Tratamiento</i>	0.3905	-
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.3576	-
Micorrización (PM, %)	<i>Hongo</i>	-	-
	<i>Tratamiento</i>	-	-
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.0038	0.0238
Potencial hídrico prealba (Ψ_{pd})	<i>Hongo</i>	-	0.7348
	<i>Tratamiento</i>	-	<0.0001
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.0030	0.1793
Tasa de fotosíntesis (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	<i>Hongo</i>	-	-
	<i>Tratamiento</i>	-	-
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	-	0.0351
Eficiencia en el Uso del Agua (UEA, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)	<i>Hongo</i>	0.3518	-
	<i>Tratamiento</i>	0.0053	-
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.1750	-
Masa foliar por área (LMA; g cm^{-2})	<i>Hongo</i>	0.0078	0.0078
	<i>Tratamiento</i>	0.0736	0.0736
	<i>Hongo*Tratamiento</i>	0.2498	0.2498

Nota: (-) parámetros No significativos, parámetros significativos ($P < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Agradecimientos

El apoyo del Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias de México (INIFAP, CORECADE NC13/83), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT 172007), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (CONICYT 2115253), por Beca de Doctorado a JL García-Rodríguez. A la Profesora Marcela Bustamante Sánchez, Facultad de Ciencias Forestales, UdeC, por facilitar equipo TDR (*Time Domain Reflectometry*).

Referencias

- Aponte C. 2011. Interacciones planta-suelo en un bosque mediterráneo. *Revista Ecosistemas* 20.
- Atala C, E Muñoz-Capponi, G Pereira, E Navarrete, R Osés, M Molina-Montenegro. 2012. Impact of mycorrhizae and irrigation in the survival of seedlings of *Pinus radiata* D. Don subject to drought. *Gayana. Botánica* 69:296.
- Augé R, K Schekel, R Wample. 1987. Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimation. *Physiologia Plantarum* 70:175-182.
- Ávila-Flores IJ, JA Prieto-Ruíz, JC Hernández-Díaz, CA Wehenkel, JJ Corral-Rivas. 2014. Preconditioning *Pinus engelmannii* carr. seedlings by irrigation deficit in nursery.
- Bota BJ, J Flexas, H Medrano. 2001. Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Annals of Applied Biology* 138:353-361.
- Boyd R, F RT, R DJ. 1986. Ectomycorrhizae and the water relations of tree. In: V G-P, G S eds. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Paris. INRA. p. 689-694.
- Boyle CD, KE Hellenbrand. 1991. Assessment of the effect of mycorrhizal fungi on drought tolerance of conifer seedlings. *Canadian Journal of Botany* 69:1764-1771.
- Brownlee C, J Duddridge, A Malibari, D Read. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. In: Atkinson D, KKS Bhat, MP Coutts, PA Mason, DJ Read eds. Tree Root Systems and Their Mycorrhizas. Developments in Plant and Soil Sciences. Dordrecht. Springer. p. 433-443.

- Calonge FD. 2009. Guía de bolsillo para el buscador de setas. Madrid, España. Mundi-Prensa Libros.
- Candel-Pérez D, ME Lucas-Borja, J Linares. 2012. Predicciones del crecimiento en poblaciones de pino laricio (*Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii*) bajo diferentes escenarios futuros de cambio climático. *Revista Ecosistemas* 21:41-49.
- Carrera-Nieva A, G López-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 10:93-98.
- Cassab GI, Y Sánchez-Guevara. 2011. Mecanismos de desarrollo y fisiología de raíces de plantas superiores.
- Castellano MA. 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. In *Concepts in mycorrhizal research*. Springer. p. 223-301.
- Claeys H, D Inzé. 2013. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* 162:1768-1779.
- Clark K, N Skowronski, M Gallagher, H Renninger, K Schäfer. 2014. Contrasting effects of invasive insects and fire on ecosystem water use efficiency. *Biogeosciences* 11:6509.
- Cleary B, J Zaerr, J Hamel. 2006. Guidelines for measuring plant moisture stress with a pressure chamber. (PMS Instrument Company). Disponible en [http://pmsinstrument.com/tutorials/Guidelines Booklet.pdf](http://pmsinstrument.com/tutorials/Guidelines%20Booklet.pdf). Consultado 10/05/2018.
- Cochard H, T Hölttä, S Herbette, S Delzon, M Mencuccini. 2009. New insights into the mechanisms of water-stress-induced cavitation in conifers. *Plant Physiology* 151:949-954.
- Colpaert JV, JA ASSCHE, K Luijstens. 1992. The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* 120:127-135.
- Chávez D, G Pereira, Á Machuca. 2014. Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *Bosque* 35:57-63.
- Davis AS, DF Jacobs. 2005. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *New Forests* 30:295-311.

- de la Riva EG, M Olmo Prieto, H Poorter, JL Ubera Jiménez, R Villar Montero. 2016a. Leaf Mass per Area (LMA) and Its Relationship with Leaf Structure and Anatomy in 34 Mediterranean Woody Species along a Water Availability Gradient. 1-18.
- de la Riva EG, A Tosto, IM Pérez-Ramos, CM Navarro-Fernández, M Olmo, NP Anten, T Marañón, R Villar. 2016b. A plant economics spectrum in Mediterranean forests along environmental gradients: is there coordination among leaf, stem and root traits? *Journal of Vegetation Science* 27:187-199.
- Dias MC, C Azevedo, M Costa, G Pinto, C Santos. 2014. Melia azedarach plants show tolerance properties to water shortage treatment: an ecophysiological study. *Plant Physiology and Biochemistry* 75:123-127.
- Dickson A, AL Leaf, JF Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle* 36:10-13.
- Domínguez-Núñez J, R Planelles, J Rodríguez-Barreal, J Saíz de Omeñaca. 2004. Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Forest Systems* 13:317-327.
- Dosskey M, R Linderman, L Boersma. 1990. Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytologist* 115:269-274.
- Duan X, DS Neuman, JM Reiber, CD Green, AM Saxton, RM Augé. 1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* 47:1541-1550.
- Duñabeitia MK, S Hormilla, JI Garcia-Plazaola, K Txarterina, U Arteche, JM Becerril. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11-18.
- Escalona JM, J Flexas, H Medrano. 2000. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Functional Plant Biology* 27:87-87.
- Ferrio J, A Florit, A Vega, L Serrano, J Voltas. 2003. $\Delta^{13}C$ and tree-ring width reflect different drought responses in *Quercus ilex* and *Pinus halepensis*. *Oecologia* 137:512-518.

- Fleming R, T Black, R Adams. 1996. Site preparation effects on Douglas-fir and lodgepole pine water relations following planting in a pinegrass-dominated clearcut. *Forest Ecology and Management* 83:47-60.
- Flexas J, H Medrano. 2002. Drought□inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non□stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89:183-189.
- Galmés J, H Medrano, J Flexas. 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist* 175:81-93.
- García-Rodríguez J-L, J Pérez-Moreno, D Ríos-Leal, P Saez-Delgado, C Atala-Bianchi, M Sánchez-Olate, G Pereira-Cancino. 2017. *In vitro* GROWTH OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH *Pinus radiata* PLANTATIONS IN CHILE. *Revista fitotecnia mexicana* 40:415-423.
- Gerhardt E, J Vila, X Llimona. 2000. Hongos de España y de Europa. Barcelona, España. Omega. 957 p.
- Gozalo M, P Villar-Salvador, R Serrada. 1998. Estudio del ritmo de crecimiento en campo de las nuevas raíces en brinzales de *Pinus halepensis* a lo largo de la temporada de plantación: Bases para establecer los momentos óptimos de plantación. Tesis Proyecto de fin de carrera. Madrid, España. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal, E.U.I.T.F. Universidad Politécnica de Madrid. 143 p.
- Guehl J-M, G Aussenac. 1987. Photosynthesis decrease and stomatal control of gas exchange in *Abies alba* Mill. in response to vapor pressure difference. *Plant Physiology* 83:316-322.
- Guehl J, J Garbaye. Year. The effects of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. In *Annales des sciences forestières*. 551-563 p.
- Guehl J, D Mousain, G Falconnet, J Gruez. Year. Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water-use efficiency of *Pinus pinea* L seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. In *Annales des sciences forestières*. 91-100 p.
- Hölttä T, E Juurola, L Lindfors, A Porcar-Castell. 2011. Cavitation induced by a surfactant leads to a transient release of water stress and subsequent 'run away' embolism in Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* 63:1057-1067.

- Hsiao TC. 1973. Plant responses to water stress. *Annual review of plant physiology* 24:519-570.
- Johnson JD. 1986. Irrigation and its implications for seedling growth and development. *Proceedings of the Southern Forest Nursery Association*.
- Johnson NC, JH Graham, F Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist* 135:575-585.
- Jones MD, SE Smith. 2004. Exploring functional definitions of mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualisms? *Canadian Journal of Botany* 82:1089-1109.
- Jury WA, H Vaux. 2005. The role of science in solving the world's emerging water problems. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 102:15715-15720.
- Kavanagh K, J Zaerr. 1997. Xylem cavitation and loss of hydraulic conductance in western hemlock following planting. *Tree physiology* 17:59-63.
- Kipfer T, T Wohlgemuth, MG van der Heijden, J Ghazoul, S Egli. 2012. Growth response of drought-stressed *Pinus sylvestris* seedlings to single-and multi-species inoculation with ectomycorrhizal fungi. *PLoS ONE* 7:e35275.
- Landis T, R Tinus, S McDonald, J Barnett. 1989. The container tree nursery manual: seedling nutrition and irrigation. USDA, Forest Service. Agric. Handbl.
- Lazarevic J, N Keca, A Martinovic. 2012. Mycorrhization of containerized *Pinus nigra* seedlings with *Suillus granulatus* under open field conditions. *Forest Systems* 21:498-507.
- Lazo W. 2016. Hongos de Chile. Atlas micológico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 223 p.
- Lebourgeois F, G Lévy, G Aussenac, B Clerc, F Willm. Year. Influence of soil drying on leaf water potential, photosynthesis, stomatal conductance and growth in two black pine varieties. In *Annales des Sciences Forestières*. 287-299 p.
- Lehto T. 1992. Effect of drought on *Picea sitchensis* seedlings inoculated with mycorrhizal fungi. *Scandinavian Journal of Forest Research* 7:177-182.
- Lehto T, JJ Zwiazek. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21:71-90.
- Levitt J. 1980. Response of plants to environmental stresses. I. Chilling, freezing, and high temperature stresses. New York. Academic Press.

- Lopushinsky W, T Max. 1990. Effect of soil temperature on root and shoot growth and on budburst timing in conifer seedling transplants. *New Forests* 4:107-124.
- Martínez DB, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque (Valdivia)* 28:226-233.
- Melzack R, B Bravdo, J Riov. 1985. The effect of water stress on photosynthesis and related parameters in *Pinus halepensis*. *Physiologia Plantarum* 64:295-300.
- Michelozzi M, F Loreto, R Colom, F Rossi, R Calamassi. 2011. Drought responses in Aleppo pine seedlings from two wild provenances with different climatic features. *Photosynthetica* 49:564-572.
- Molina-Montenegro MA, CL Quiroz, C Torres-Díaz, C Atala. 2011. Functional differences in response to drought in the invasive *Taraxacum officinale* from native and introduced alpine habitat ranges. *Plant Ecology & Diversity* 4:37-44.
- Mooney HA, EL Dunn. 1970. Convergent evolution of Mediterranean-climate evergreen sclerophyll shrubs. *Evolution* 24:292-303.
- Morales D, J Peters, MS Jiménez, M Tausz, A Wonisch, D Grill. 1999. Gas exchange of irrigated and non-irrigated *Pinus canariensis* seedlings growing outdoors in La Laguna, Canary Islands, Spain. *Zeitschrift für Naturforschung C* 54:693-697.
- Morte A, G Díaz, P Rodríguez, J Alarcón, M Sánchez-Blanco. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* 44:263-267.
- Navarro-García A, SdPB Árias, A Morte, MJ Sánchez-Blanco. 2011. Effects of nursery preconditioning through mycorrhizal inoculation and drought in *Arbutus unedo* L. plants. *Mycorrhiza* 21:53-64.
- Oliet J, R Planelles, M López Arias, F Artero. 2002. Soil water content and water relations in planted and naturally regenerated *Pinus halepensis* Mill. seedlings during the first year in semiarid conditions. *New Forests* 23:31-44.
- Ortega U, M Dunabeitia, S Menendez, C Gonzalez-Murua, J Majada. 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.

- Pallardy S, J Čermák, F Ewers, M Kaufmann, W Parker, J Sperry. 1995. Water transport dynamics in trees and stands. In Resource physiology of conifers. Elsevier. p. 301-389.
- Pardos M, R Calama, C Mayoral, G Madrigal, M Sanchez-Gonzalez. 2015. Addressing post-transplant summer water stress in *Pinus pinea* and *Quercus ilex* seedlings. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 8:348.
- Pennisi E. 2008. The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* 320:171-173.
- Pereira G, J Herrera, A Machuca, M Sánchez. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28:215-219.
- Peters J, D Morales, MS Jimenez. 2003. Gas exchange characteristics of *Pinus canariensis* needles in a forest stand on Tenerife, Canary Islands. *Trees* 17:492-500.
- Prieto-Ruiz J, E Cornejo-Oviedo, P Domínguez-Calleros, JdJ Navar-Chaidez, J Marmolejo-Moncivais, J Jiménez-Pérez. 2004. Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* 13:443-451.
- Prieto-Ruiz JÁ, RJ Almaraz Roldán, JJ Corral-Rivas, A Díaz Vázquez. 2012. Efecto del estrés hídrico en *Pinus cooperi* Blanco durante su precondicionamiento en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3:19-28.
- Querejeta J, L Egerton-Warburton, M Allen. 2007. Hydraulic lift may buffer rhizosphere hyphae against the negative effects of severe soil drying in a California Oak savanna. *Soil Biology and Biochemistry* 39:409-417.
- Querejeta J, LM Egerton-Warburton, MF Allen. 2003. Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. *Oecologia* 134:55-64.
- Read D, R Boyd. 1986. Water relations of mycorrhizal fungi and their host plants. *Water, fungi and plants. Cambridge University Press, Cambridge*:287-303.
- Reich P, M Tjoelker, M Walters, D Vanderklein, C Buschena. 1998. Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* 12:327-338.
- Reich P, M Walters, D Ellsworth. 1992. Leaf life span in relation to leaf, plant, and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological monographs* 62:365-392.

- Reichstein M, JD Tenhunen, O Roupsard, Jm Ourcival, S Rambal, F Miglietta, A Peressotti, M Pecchiari, G Tirone, R Valentini. 2002. Severe drought effects on ecosystem CO₂ and H₂O fluxes at three Mediterranean evergreen sites: revision of current hypotheses? *Global Change Biology* 8:999-1017.
- Renninger HJ, NJ Carlo, KL Clark, KVR Schafer. 2015. Resource use and efficiency, and stomatal responses to environmental drivers of oak and pine species in an Atlantic Coastal Plain forest. *Frontiers in plant science* 6:297.
- Rincón A, IF Alvarez, J Pera. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-271.
- Robakowski P, E Bielinis. 2017. Needle age dependence of photosynthesis along a light gradient within an *Abies alba* crown. *Acta Physiologiae Plantarum* 39:83.
- Salle A, H Ye, A Yart, F Lieutier. 2008. Seasonal water stress and the resistance of *Pinus yunnanensis* to a bark-beetle-associated fungus. *Tree physiology* 28:679-687.
- Sands R, C Theodorou. 1978. Water uptake by mycorrhizal roots of radiata pine seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* 5:301-309.
- Steinfeld D, MP Amaranthus, E Cazares. 2003. Survival of ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws.) seedlings outplanted with *Rhizopogon* mycorrhizae inoculated with spores at the nursery. *Journal of Arboriculture* 29:197-208.
- Stenström E, M Ek. 1990. Field growth of *Pinus sylvestris* following nursery inoculation with mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research* 20:914-918.
- Subramanian K, C Charest, L Dwyer, R Hamilton. 1995. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytologist* 129:643-650.
- Tateishi T, K Yokoyama, N Kohno, H Okabe, T Marumoto. 2003. Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. *Soil science and plant nutrition* 49:641-645.
- Theodorou C. 1971. Introduction of mycorrhizal fungi into soil by spore inoculation of seed. *Australian Forestry* 35:23-26.
- Theodorou C, G Bowen. 1970. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi. *Australian Forestry* 34:183-191.

- Tibbett M, F Sanders. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Ann Bot* 89:783-789.
- Valladares F, G Sánchez. 2006. Ecophysiological traits associated with drought in Mediterranean tree seedlings: individual responses versus interspecific trends in eleven species. *Plant Biology* 8:688-697.
- Vilagrosa A, P Villar-Salvador, J Puértolas. 2006. El endurecimiento en vivero de especies forestales mediterráneas. In: Cortina J, JL Peñuelas Rubira, J Puértolas, R Savé, A Vilagrosa eds. Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos. Madrid, España. Ministerio de Medio Ambiente. p. 119-140.
- Villar-Salvador P. 1998. Aspectos funcionales de las plantas frente a estrés hídrico: comparación de diferentes estrategias. Jornadas de producción de planta forestal de vivero. Ministerio de Medio Ambiente, Valsain, noviembre de 1998.
- Villar-Salvador P, L Ocaña, J Peñuelas, I Carrasco. 1999. Effect of water stress conditioning on the water relations, root growth capacity, and the nitrogen and non-structural carbohydrate concentration of *Pinus halepensis* Mill. (Aleppo pine) seedlings. *Annals of forest science* 56:459-465.
- Villar-Salvador P, R Planelles, J Oliet, JL Peñuelas-Rubira, DF Jacobs, M González. 2004. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree physiology* 24:1147-1155.
- Wan X, SM Landhäusser, JJ Zwiazek, VJ Lieffers. 1999. Root water flow and growth of aspen (*Populus tremuloides*) at low root temperatures. *Tree physiology* 19:879-884.
- Wright IJ, PB Reich, M Westoby, DD Ackerly, Z Baruch, F Bongers, J Cavender-Bares, T Chapin, JH Cornelissen, M Diemer. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428:821.
- Yang Y, C Li. 2016. Photosynthesis and growth adaptation of *Pterocarya stenoptera* and *Pinus elliottii* seedlings to submergence and drought. *Photosynthetica* 54:120-129.

CAPÍTULO VII

Discusión general

A pesar de no ser un enfoque nuevo, el manejo apropiado de las relaciones suelo-planta-microorganismo sigue siendo un enfoque promisorio en el manejo biotecnológico para lograr sistemas agrícolas y forestales estables y productivos a largo plazo (Barea *et al.* 1996, Varela y Trejo 2001). En este trabajo se presentan resultados de algunas fases del proceso de manejo biotecnológico de HECM que inició con la recolección de carpóforos en plantaciones adultas de *Pinus radiata* D Don. en la Región del Biobío, Chile; y la respectiva caracterización macro y micromorfológica, así como de las variables de crecimiento en cultivos puros. Continúo con la inoculación de plantas de *Pinus* cultivadas en condiciones controladas y en vivero; seguida de la caracterización macro y micromorfológica de las ectomicorrizas entre estos HECM y plantas de pino, culminando con la evaluación del efecto de la colonización micorrícica sobre parámetros morfofisiológicos de calidad de planta. Al igual que en estudios como el de Rincón *et al.* (1999), en el presente estudio, las especies de los géneros *Rhizopogon* y *Suillus* probadas fueron de fácil manejo biotecnológico, resultando de rápido aislamiento en cultivos puros en el 90% de los casos al primer intento; especialmente cuando se utilizan carpóforos juveniles y en un adecuado estado físico (Torres 1992). Fernández-Miranda (2007), menciona que una característica importante para la selección de hongos micorrícicos, es que sean manipulables biotecnológicamente en laboratorio.

En el presente estudio existieron diferencias de las características macro (color, textura, margen de la colonia) y microscópicas (dimensiones de la estructura miceliar) entre cepas de los géneros *Rhizopogon* sp. y *Suillus* sp. En contraste con los resultados de trabajos como el de Torres (1992) donde el micelio de *R. luteolus* y algunas especies *Suillus* (especialmente *S. granulatus*) presentan grandes similitudes macro y micromorfológicas debido a la relación filogenética de estos géneros. El micelio de las colonias de *Rhizopogon luteolus* obtenidos en este estudio presentaron gran similitud en sus características macro y microscópicas con los obtenidos por Torres (1992) y Sánchez *et al.* (2000) aunque con *Rhizopogon roseolus* en MNM. Pero con gran similitud en sus junto con los micelios de cepas de *Suillus granulatus* y *S. luteus* a las

características macro y microscópicas con los obtenidos por Miller *et al.* (1983) y Torres y Honrubia (1993). Y para las características miceliares de *Suillus granulatus* y *S. luteus* con lo reportado por Nouhra y Becerra (2001) y Barros *et al.* (2006) de forma respectiva. En cultivo puro *S. granulatus* formó rizomorfos, mientras que *S. luteus* produjo gran cantidad de exudados adheridos a las paredes hifales. Esta característica puede ser determinante para su cultivo en medios nutritivos, ya que estos exudados acidifican el pH del medio de cultivo ocasionando una autoinhibición del crecimiento como sucede con otras especies como *Pisolithus tinctorius* (García-Rodríguez *et al.* 2006) y para *S. granulatus* y *S. luteus* (García-Rodríguez *et al.* 2017).

En cultivo puro, las tres especies de HECM probadas, se ven afectadas significativamente por la temperatura de cultivo en cuanto a su tasa de crecimiento radial (RG) e incremento en biomasa micelar (MB), como es reportado en estudios como los de Marx *et al.* (1970), Sánchez *et al.* (2001) y Lazarević *et al.* (2016). El mejor crecimiento para las tres especies del HECM, en términos de RG y de MB, se alcanzó a 24°C; y cuando se aumenta la temperatura a 28 y 32°C, se observó un efecto negativo en estas variables. *R. luteolus* es la especie de HECM con los mayores valores de GR y MB y los menores valores de estas variables se observaron en cepas de *S. luteus*. Sin embargo *R. luteolus* fue más sensible a los cambios de pH del medio de cultivo. En estudios como los de Jha *et al.* (2006) y Pereira *et al.* (2007) se encontraron tendencias similares para *R. luteolus*. Por su parte Vázquez-García *et al.* (2002) observan crecimiento óptimo para *Rhizopogon* sp. en medio BAF a pH 6.0, el cual disminuye significativamente cuando el pH aumenta o disminuye. No obstante, Duñabeitia *et al.* (2004) no encontraron cambios en cuanto al diámetro de la colonia y la biomasa micelial de *R. luteolus* cuando se modificó el pH. Pereira *et al.* (2014) y Santelices *et al.* (2012) encuentran que el crecimiento micelial *in vitro* de un hongo cambia según el medio de cultivo utilizado y las condiciones de cultivo experimentales. Sin embargo, el no haber agregado buffers biológicos en el medio de cultivo pudo ocasionar la carencia de tendencias significativas en el experimento de pH. Guerin-Laguet *et al.* (2000), demostraron la importancia del uso de buffers biológicos en los experimentos de pH donde se evalúa el crecimiento fúngico.

Las tres especies de HECM estudiadas *in vitro*, presentaron en su crecimiento micelial las fases de adaptación, crecimiento exponencial, declinación y estacionaria al igual que Manero-Colín

et al. (2012) y Sánchez y Royse (2001). Las respuestas de crecimiento *in vitro* registradas en el presente estudio mostraron el gran potencial de *R. luteolus* para ser utilizado en futuros programas de micorrización controlada para la producción en vivero de árboles de *Pinus radiata* en Chile. Las esporas de *R. roseolus*, *S. granulatus* y *S. luteus* en suspensión, empleadas en este estudio como inoculantes, produjeron adecuados porcentajes de colonización en los sistemas radicales de las especies del género *Pinus* utilizadas. A este respecto Rincón *et al.* (1999) mencionan que la capacidad colonizadora de un hongo es un criterio de selección para ser candidato en los programas de inoculación de viveros. En el presente estudio todas las combinaciones hongo-pino presentaron abundantes estructuras ectomicorrícicas al momento de la evaluación (12 meses de cultivo). Los resultados del presente trabajo confirman, mediante micorrización controlada, la capacidad colonizadora de las especies fúngicas y su compatibilidad con las especies del género *Pinus* probadas. Existe poca o nula información sobre la caracterización de las ectomicorrizas formadas por las especies de micobiontes y fitobiontes probadas en este estudio. Por lo anterior, se puede considerar que todas las especies de HECM probadas en este estudio, tienen potencial relevante en la micorrización controladas de las especies del género *Pinus* utilizadas. Desde este punto de vista, la síntesis micorrícica entre las especies de *Pinus* y de HECM probadas cumplió su objetivo que fue conocer el rango de especies fúngicas simbioses para las especies arbóreas (Torres 1992).

Al estudiar las características morfoanatómicas de las ectomicorrizas de las cuatro especies de pino utilizadas con dos especies de HECM probadas, todas las combinaciones hongo-pino presentaron ramificaciones dicotómicas simples a excepción de la combinación *R. luteolus* + *P. pinea* fue la única combinación que presentó ramificación tipo coraloide. Esta misma combinación fue la que mayor grosor de manto fúngico presentó ($73.97 \pm 3.24 \mu\text{m}$), los menores valores para esta estructura coincidentemente fueron en *P. pinaster* + *R. luteolus* ($16.41 \pm 0.79 \mu\text{m}$) y *S. luteus* ($29.38 \pm 1.08 \mu\text{m}$). Al respecto Rincón *et al.* (1999) mencionan que esta característica podría ser de interés en la selección de HECM para inocular plantas de *P. pinea*, destinadas a ser establecidas en sitios con suelos de baja disponibilidad hídrica y climas de tipo mediterráneo. De acuerdo con Taylor y Alexander (2005), esta característica del manto fúngico junto con el porcentaje de colonización de ápices radicales, sugiere que el huésped está efectivamente aislado del entorno (del suelo). Este aislamiento tiene serias implicaciones en el

flujo de nutrientes y de agua que ingresa a la raíz, pues estos deben pasar primero a través del manto fúngico. Estos mismos autores mencionan que los HECM ocupan y, probablemente controlan la interfaz entre el ambiente del suelo y la planta huésped. Siendo los mantos los que determinen los flujos dentro y fuera de la raíz, y que el micelio que se extiende desde la superficie del manto (micelio extramatricial) sea considerado el sitio primario para absorción de nutrientes y agua. Todas las combinaciones hongo-pino produjeron rizomorfos de forma importante, pero *S. luteus* + *P. pinaster* fue la combinación que produjo este tipo de estructuras miceliales en forma por demás abundante. Los rizomorfos son órganos diferenciados (multi hifas) producidos por varios hongos basidiomicetos ectomicorrícicos y saprofitos, y algunos ascomicetes, durante el crecimiento a través del suelo (Duddridge *et al.* 1980, Cairney 1992).

Los resultados del presente estudio indican que todas las especies de HECM probadas tienen potencial relevante en la micorrización controladas de las especies del género *Pinus* utilizadas. En los ensayos de micorrización en condiciones controladas y de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo en el vivero, muestran que las esporas de hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* en suspensión, son una fuente de inóculo eficaz, de fácil aplicación y relativo bajo costo. Bassani *et al.* (2013), mencionan que las esporas de HECM como fuente de inóculo para la producción de plantas en vivero a gran escala son una buena opción, sencilla y eficaz, aunque su actividad decrece significativamente con el tiempo desde que sus esporas son cosechadas. Para la utilización de esporas en las prácticas de inoculación de plantas en vivero es aconsejable establecer las dosis óptimas de aplicación (Pera y Parladé 2005). Rincón *et al.* (2001), encuentran excelentes niveles de micorrización al aplicar soluciones esporales a concentraciones de 1×10^7 esporas/planta. Parladé *et al.* (1996), utilizaron rangos de inoculación esporal de 1×10^2 y 1×10^7 esporas/planta, encontrando dosis de aplicación óptimas en rangos de 1×10^5 y 1×10^7 esporas/planta, para diferentes HECM. En el presente estudio, particularmente en el ensayo en condiciones controladas de cultivo, no se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones probadas 1×10^7 y 1×10^8 esporas/planta, por lo que se sugiere en futuros programas de micorrización el empleo de la dosis más baja por ser técnica, eficaz y económicamente factible.

En los dos ensayos de inoculación controlada, *Pinus canariensis*, *P. pinaster*, *P. pinea* y *P. radiata* muestran susceptibilidad a ser micorrizadas por los HECM *R. luteolus* y *S. luteus* produciendo estructuras micorrícicas como el manto fúngico y red de Hartig bien definidos en los sistemas radicular de estas especies. En el primer ensayo a los 12 meses de edad y a los 24 meses en el segundo ensayo en vivero, los PM alcanzados (mayores al 80% y 60%, respectivamente) se consideran de niveles medios a altos de acuerdo con Tateishi *et al.* (2003). Más aún si se comparan con los resultados de Steffen *et al.* (2017) en plantas de *P. elliottii* (27.8%). Por su parte Ortega *et al.* (2004), reportan PM del 30% en las raíces de plantas de *P. radiata* inoculadas con los HECM *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum*. Sin embargo, Duñabeitia *et al.* (2004) observaron PM del 50% en plantas colonizadas con *S. citrinum* y del 80% en plantas inoculadas con *R. luteolus* y *R. roseolus*. Domínguez-Núñez *et al.* (2004), al inocular plantas de *P. halepensis* con suspensiones esporales de *Tuber melanosporum* obtuvieron PM iniciales del 20% y cercanos al 30% al final de su ensayo. En el primer ensayo la especie *R. luteolus* aplicada en forma individual o en combinación con *S. luteus* los resultados fueron superiores a los obtenidos por Chávez *et al.* (2009). Sin embargo, en el segundo ensayo *S. luteus* inoculado de forma individual, en plantas sometidas a disponibilidad hídrica baja, fue la que mayores PM alcanzó. Domínguez-Núñez *et al.* (2004), al inocular plantas de *P. halepensis* con suspensiones esporales de *Tuber melanosporum* obtuvieron PM iniciales del 20% y cercanos al 30% al final de su ensayo. Al respecto, las diferencias en los PM que suelen ocurrir al realizar micorrizaciones controladas en viveros enfatizan la importancia de las especies, cepas o ecotipos de HECM a seleccionar y las técnicas de inoculación a utilizar, así como las técnicas de inoculación a utilizar (Cordell *et al.* 1987, Trappe 1987, González-Ochoa *et al.* 2003).

En el primer ensayo en condiciones controladas, si bien la tendencia del crecimiento aéreo, especialmente para *P. canariensis*, *P. pinaster* y *P. pinea*, es siempre mayor en las plantas inoculadas con HECM al compararlas con el tratamiento control, no se encuentra un efecto significativo de la inoculación con los HECM probados a 12 meses del cultivo. Sólo las plantas de *P. pinaster* inoculadas con *S. luteus* presentaron mayor DAC. Lo anterior concuerda con otros estudios, Honrubia *et al.* (1997) para *P. halepensis*, Rincón *et al.* (2005) para *P. pinea*, Martínez *et al.* (2007) para *P. ponderosa*, Chávez *et al.* (2009) para *P. radiata*, Lazarevic *et al.*

(2012) para *P. nigra*. Duñabeitia *et al.* (2004), encuentran diferencias significativas en el crecimiento aéreo de *P. radiata* dependiendo de la especie de HECM empleado, y del tipo de inoculo aplicado como lo observaron Chávez *et al.* (2009). De igual forma, en el segundo ensayo en condiciones de vivero y tres niveles de disponibilidad hídrica del suelo, la tendencia es que la plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* presentan mayor crecimiento aéreo al ser inoculadas con *S. luteus*. Al respecto, Martínez-Reyes *et al.* (2012) reportan que el diámetro, la altura y la producción de biomasa total de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con el HECM *Hebeloma mesophaeum* aumentan hasta dos veces más en comparación con plantas no micorrizadas. Kipfer *et al.* (2012), encontraron que en específico la presencia de *Suillus granulatus*, aumentó considerablemente la biomasa aérea de las plántulas de *Pinus sylvestris* en comparación con las plantas no micorrizas. De igual forma, Domínguez-Núñez *et al.* (2004) al inocular plantas de *P. halepensis* con suspensiones esporales de *Tuber melanosporum* obtuvieron para todos los parámetros una mejora significativa en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas dos meses después de la inoculación. Sin embargo, se han observado respuestas diferenciales entre especies que confirman el hecho de que los HECM no siempre actúan como mutualistas, sino que según el genotipo de la especie fúngica o del entorno biótico y abiótico pueden actuar como mutualistas o parásitos (Johnson *et al.* 1997). Al respecto, Martínez *et al.* (2007) reportan que la inoculación con esporas de *Rhizopogon roseolus* no produjo un aumento del tamaño (biomasa) en plantas de *P. ponderosa* durante la etapa de vivero. Y Rincón *et al.* (2005) observaron que al inocular plantas de *P. pinea* con esporas de cuatro especies de HECM no se obtiene un efecto positivo, e incluso atribuyen una disminución en el crecimiento de las plantas a la inoculación con estos hongos. No obstante lo anterior Martínez *et al.* (2007), insisten en que la inoculación con HECM, como práctica de cultivo en vivero, contribuye a garantizar la supervivencia y el buen crecimiento de las plantas en los sitios de reforestación, debido a que es donde la micorrización puede mostrar sus verdaderos efectos.

Los atributos morfológicos (altura, diámetro, producción de biomasa) han sido ampliamente utilizados para evaluar la respuesta de las plantas a la micorrización (Honrubia *et al.* 1997, Duñabeitia *et al.* 2004, Rincón *et al.* 2005, Martínez *et al.* 2007, Chávez *et al.* 2009, Domínguez-Núñez *et al.* 2013). Así como índices que involucran valores a partir de atributos morfológicos entre ellos el índice de calidad de Dickson (Gandini *et al.* 2015, Carmo *et al.* 2016) y el índice

de robustez (IR) (Martínez-Nevárez *et al.* 2015). En el primer ensayo de inoculación del presente estudio, en general las plantas de mayor calidad de acuerdo con el índice de calidad de Dickson (ICD) son las de *P. canariensis*; sin embargo, sólo existieron diferencias significativas en plantas de *P. radiata* inoculadas con *R. luteolus* con la carga esporal C1. Existió también una relación positiva moderada entre el PM y el ICD ($r^2=0.34$), que ratifica los beneficios de la inoculación micorrícica, pero sobre la necesidad de estudios para la correcta selección de combinaciones planta-hongo y así la relación sea más eficiente en aumentar la calidad de planta. En el segundo ensayo de inoculación de este estudio, la especie de hongo, la disponibilidad hídrica del suelo y la interacción de estos factores, no tuvo influencia sobre el comportamiento del ICD en plantas de ambas especies de pino. Por el contrario, plantas de *P. canariensis* no inoculadas fueron diferentes en el IR de las plantas inoculadas con *R. luteolus* y *S. luteus*. En este mismo ensayo, el peso seco de nuevas raíces (PSNR) en plantas de *P. canariensis* inoculadas con *S. luteus* fue mayor en el tratamiento T2 (disponibilidad hídrica baja) en comparación con los PSNR resultantes en los tratamientos T1 y T0 (disponibilidad hídrica media y baja, respectivamente). Salle *et al.* (2008), mencionan que la inducción del estrés hídrico estimula el crecimiento de la raíz y favorece la absorción de agua, siempre y cuando la parte aérea tenga una tasa de fotosíntesis adecuada.

Menos son los trabajos en donde se evalúan aspectos fisiológicos y estados de micorrización de las plantas (Makita *et al.* 2012, Chen *et al.* 2015, Rentería-Chávez *et al.* 2017). La tasa de fotosíntesis, conductancia estomática, la eficiencia del uso del agua (EUA) y la masa foliar por área (LMA). En el presente estudio, en los dos ensayos de inoculación, las tasas de g_s y asimilación neta de CO_2 para plantas micorrizadas y no micorrizadas, están altamente relacionadas. En el primer ensayo fueron las plantas de *P. pinea* en las existieron los mayores valores para la g_s , no obstante, plantas de *P. pinaster* tuvieron altas tasas de A_N con valores de g_s no tan elevados. Sin embargo, estos resultados no permitieron determinar una tendencia clara del efecto de la inoculación con HECM sobre la A_N de las especies de pino utilizadas. Por el contrario, trabajos como el de Makita *et al.* (2012) mostraron que la tasa de fotosíntesis es mayor en plántulas de *Quercus serrata* inoculadas con *Scleroderma citrinum*, *Laccaria amethystea* y *Astraeus hygrometricus* en comparación con las plantas del tratamiento control y de las inoculadas con *P. tinctorius*, sugiriendo que no todas las especies de HECM son efectivas para

estimular la fotosíntesis. Producto de los efectos del calentamiento global se encuentra la reducción de la disponibilidad hídrica en los suelos de cultivo, se prevé que la frecuencia y la gravedad de las condiciones de estrés por sequía aumentará dramáticamente en el futuro (Claeys y Inzé 2013). Flexas y Medrano (2002), mencionan que bajo estrés hídrico los estomas reducen su grado de apertura para evitar la desecación bajo condiciones de sequía. Posteriormente, la fotosíntesis se ve afectada por la deficiencia interna de agua. La fotosíntesis neta se reduce inevitablemente debido a la limitada disponibilidad de CO₂ a nivel de cloroplastos (Yang y Li 2016). En el segundo ensayo las tasas de g_s y A_N en plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* sometidas a tres tratamientos de disponibilidad hídrica, las respectivas curvas de luz estuvieron altamente relacionadas, mostraron también las diferencias en los niveles de A_N entre especies, siendo las plantas de *P. canariensis* las que presentaron tasas de A_N menores a las de las plantas de *P. pinaster*. Al igual que para Escalona *et al.* (2000) en general el mejor ajuste de los datos para cada especie fue a una función hiperbólica. En plantas de *P. pinaster* la tasa de A_N fue mayor en el tratamiento de menor disponibilidad hídrica (T0) al ser inoculadas con suspensiones esporales de *R. luteolus* y *S. luteus*. De igual forma los resultados concuerdan con los de estudios donde la tasa de g_s es mayor en plantas micorrizadas que en plantas no micorrizadas sometidas a sequía, como consecuencia de una mayor absorción de agua (Augé *et al.* 1987, Subramanian *et al.* 1995, Duan *et al.* 1996), lo que permite el mantenimiento de mayores tasas de fotosíntesis y mayores contenidos de agua en las plantas con micorrizas (Morte *et al.* 2001). Sin embargo, por lo general potenciales hídricos bajos indican baja actividad fisiológica (Fleming *et al.* 1996, Kavanagh y Zaerr 1997), altos niveles del potencial hídrico prealba en especies como *P. halepensis* se relacionan con una baja tasa de asimilación neta ($0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para un potencial hídrico $\Psi_x = -1.6 \text{ MPa}$) (Melzack *et al.* 1985).

En el segundo ensayo de inoculación, las plantas de *P. canariensis* presentaron diferencias significativas en la eficiencia del uso del agua (*EUA*), producto de los tratamientos de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo. Aunque no fueron estadísticamente diferentes en general las plantas de *P. canariensis* inoculadas presentaron valores promedio de *EUA* mayores que las plantas sin inocular. Duñabeitia *et al.* (2004), obtuvieron valores de *EUA* más altos para plantas de *P. radiata* colonizadas con *R. luteolus*, *R. roseolus* y *S. citrinum* que en las plantas no inoculadas, sugiriendo que existió un acoplamiento adecuado entre la tasa de asimilación de

CO₂ y la conductancia estomática. Asimismo, Guehl y Garbaye (1990) y Guehl *et al.* (1990) sugirieron que la mejoría en la *EUA* está relacionada también con un efecto nutricional, en especial con una mejor absorción de P (fósforo) debida a la colonización micorrícica, lo que tendría una influencia en la asimilación de CO₂ así como en la *g_s* de plántulas colonizadas. *P. canariensis* en el tratamiento T0 (disponibilidad hídrica baja) fue la especie que presentó los mayores valores de *EUA*. Este fue uno de los tratamientos en el que se presentaron menores tasas de *g_s*; a pesar de no existir diferencias significativas, indicarían que la tasa de transpiración y por consecuencia la tasa de asimilación de CO₂ de estas plantas fue reducida y, por tanto, las plantas de *P. canariensis* tuvieron mayor tolerancia a la sequía. Lo anterior es consistentemente con Flexas y Medrano (2002) y Galmés *et al.* (2007b) quienes mencionan que la mejora en la *EUA* bajo la sequía se logra mediante una abertura estomática reducida para una tasa de asimilación de carbono determinada, y que se sabe ocurre como resultado del proceso de adaptación y aclimatación.

En las plantas de *P. canariensis* inoculadas con *S. luteus* presentaron diferencias significativas en la masa foliar por área (*LMA*), siendo éstas las que mayores valores de esta variable presentaron. Es posible que la inoculación de con una especie de HECM determinada puede influenciar comportamiento de la *LMA* de las plantas de esta especie de pino. Sin embargo, no se encontraron estudios relacionados con el tema. Aunque no existieron diferencias significativas a nivel de tratamiento, en general los valores de *LMA* más altos existieron en los tratamientos T1 y T2, y los más bajos en el T0. Una *LMA* baja muestra una adaptación para la producción rápida de biomasa, mientras que una *LMA* alta indica una conservación eficiente de nutrientes (Lambers y Poorter 1992). De acuerdo con Aponte (2011) los rasgos foliares reflejan las estrategias de adaptación de las especies vegetales a las condiciones ambientales y a la disponibilidad de recursos a la vez que influyen en los procesos del ecosistema. Los valores de *LMA* fueron mayores en plantas de *P. pinaster* en comparación con las plantas de *P. canariensis* aun así las plantas de *P. pinaster* no mostraron diferencias significativas por especie de HECM, por tratamiento de disponibilidad de hídrica y/o por la interacción de estos factores. En general la mayor *LMA* se observó en las plantas inoculadas con *R. luteolus* y en el tratamiento T0 (de disponibilidad hídrica alta). Contrariamente de la Riva *et al.* (2016a), mencionan que las especies con alta *LMA* se encuentran en hábitats con baja disponibilidad hídrica. Los valores

más altos de *LMA*, como en el caso de *P. pinaster* en este estudio, se relacionan con una larga vida útil de la hoja, la retención de nutrientes y la protección contra la desecación (Mooney y Dunn 1970, de la Riva *et al.* 2016b). Por el contrario, valores más bajos de *LMA*, como en el caso de *P. canariensis* en el presente estudio, confieren una ventaja en la eficiencia de la captación de recursos, al aumentar la superficie de absorción por unidad de biomasa tisular (Reich *et al.* 1992, Wright *et al.* 2004). La masa foliar por área (*LMA*) es un rasgo morfológico ampliamente utilizado como un buen indicador del funcionamiento de la planta (tasa fotosintética y respiratoria, composición química etc.). En general, el *LMA* es más alta en las coníferas en comparación con los otros grupos funcionales de plantas y aumenta con la edad de la hoja. Los rasgos fisiológicos de la hoja como la tasa neta de asimilación de CO₂ (P), la respiración oscura (Rd) y el contenido de nutrientes en la hoja están estrechamente relacionados con el *LMA* (Reich *et al.* 1998, Wright *et al.* 2004).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer ensayo de inoculación, el comportamiento de los diferentes parámetros morfofisiológicos analizados en las plantas de las dos especies de pino, aunque no en todos los casos, mostraron que la micorrización controlada con dos especies de HECM tuvo un efecto positivo dependiendo de las combinaciones de micobiontes y fitobiontes propuestas. En consecuencia se comprobó en parte la hipótesis que las micorrizas mejoran las relaciones hídricas y el estado nutricional de las plantas micorrizadas (Lehto y Zwiazek 2011). De igual forma en el segundo ensayo de inoculación, el comportamiento de algunas variables morfofisiológicas se vio influenciado por la inoculación de HECM, por los diferentes tratamientos aplicados o por la interacción de estos factores. Como se ha observado en otros trabajos (Read y Boyd 1986), los resultados obtenidos sugieren que los beneficios de la colonización micorrízica, se manifestaron particularmente bajo condiciones de estrés. No obstante, el desempeño de en algunas de las variables analizadas en las plantas de las especies de pino son producto de la aclimatación del crecimiento cuando este ocurre bajo condiciones de baja disponibilidad hídrica, demostrando que estas especies de pino poseen marcada tolerancia a la sequía, que puede ser potenciada al utilizar a la micorrización controlada con especies de HECM apropiadas. Resultados como los de Ortega *et al.* (2004) indican que buenas prácticas de cultivo más programas de inoculación micorrízica compatibles aseguran que las raíces de

plántulas, como las de *P. radiata*, colonizadas con hongos micorrícicos dan como resultado un crecimiento mejorado después del trasplante en campo.



CAPÍTULO VIII

Conclusiones generales

En la síntesis micorrícica y ambos ensayos de inoculación, los resultados muestran la compatibilidad y la eficacia de las suspensiones esporales (1×10^7 y 1×10^8) de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* como fuente de inóculo de fácil aplicación y relativo bajo costo para la micorrización controlada de plantas de *Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster*, y *P. radiata*. Las concentraciones esporales probadas no presentaron diferencias significativas en el grado de micorrización lograda por las plantas en los dos periodos de estudio, siendo por ello recomendable la dosis más baja a utilizar en futuros programas de micorrización por ser técnica, eficaz y económicamente factible.

Aunque las descripciones de ECM basadas en material sintetizado *in vitro*, o en condiciones controladas tienen cierto límite de validez, debido a que bajo condiciones artificiales de crecimiento no suelen manifestarse todas las características que ocurren en forma natural. En el presente estudio existieron variaciones en las estructuras ectomicorrícicas en función de las combinaciones hongo-pino, incluso tratándose de la misma especie fúngica. La caracterización de las ectomicorrizas formadas por diferentes combinaciones hongo-planta permitió conocer las características morfoanatómicas generales para identificar los micobiontes involucrados aun cuando se carezca de carpóforos.

Los resultados de cultivo *in vitro* indicaron que la tasa media de crecimiento radial y el aumento de la biomasa de las cepas de *R. luteolus*, *S. granulatus* y *S. luteus* son significativamente afectadas por el aumento de la temperatura. La temperatura óptima de cultivo para todas las especies evaluadas fue de 24 °C. Al no utilizar buffers biológicos en el cultivo, la variabilidad del pH del medio, en el rango de 4,8 a 6,8, no afectó significativamente el crecimiento micelial de especies de *S. granulatus* y *S. luteus*. Sin embargo, *R. luteolus* disminuyó su crecimiento cuando se aumentó el pH. *R. luteolus* fue la especie que mostró la mayor producción de micelio, por lo que también mostró el mayor potencial para la producción a gran escala de inóculo micelial, útil en la producción de árboles de *Pinus radiata* ectomicorrizados.

En el primer ensayo de inoculación en condiciones controladas (*Pinus canariensis*, *P. pinea*, *P. pinaster*, y *P. radiata* a los 12 meses de edad) y en segundo ensayo en condiciones controladas, de vivero y diferentes niveles de disponibilidad hídrica (*P. canariensis* y *P. pinaster* a los 24 meses de edad), la inoculación con suspensiones esporales de los hongos ectomicorrícicos (HECM) *R. luteolus* y *S. luteus* en general, produjo altos porcentajes de colonización micorrícica (PM) mayores al 80% y 60%, respectivamente.

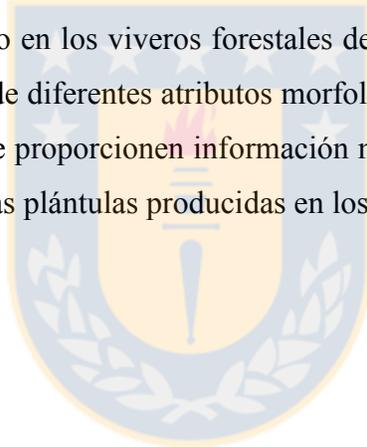
El primer ensayo de inoculación controlada en condiciones controladas, el porcentaje de micorrización (PM) producido por los HECM *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus* tuvo efecto positivo pero diferenciado sobre los valores medios de algunas variables morfológicas y fisiológicas en función de la combinación planta-hongo probadas. Aunque se encontraron diferencias significativas para algunas variables morfológicas y fisiológicas en función de los tratamientos aplicados, la evidencia es insuficiente para definir un tratamiento como superior que por tanto, indique de forma contundente la mejor combinación planta-hongo, por lo que es aconsejable proseguir con la evaluación de estos tratamientos durante mayor tiempo.

En el segundo ensayo de inoculación en condiciones controladas, vivero y diferentes niveles de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo, el PM varió en función de las especie de micobiontes y fitobiontes, siendo en general los tratamiento de disponibilidad hídrica media y baja (T1 y T2) en los que ambas especies de HECM produjeron los promedios mayores de PM. En la mayoría de los casos se observa que *S. luteus* promueve efectos positivos sobre los diferentes parámetros morfofisiológicos de plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster*, particularmente bajo condiciones de disponibilidad hídrica media y baja. Los beneficios que aporta la inoculación de *R. luteolus* sobre las variables morfofisiológicas en plantas de las dos especies de pino fueron menos frecuentes y sobre todo a niveles medios de disponibilidad hídrica del suelo de cultivo impuestos.

Dos de los tres niveles de disponibilidad hídrica impuestos provocaron el descenso del potencial hídrico prealba induciendo un estrés hídrico severo, esto ocasionó el ajuste del potencial osmótico de las plantas de las dos especies de pino, pero no existió mortandad. Esto sugiere que

por sí mismas las dos especies de pino poseen los mecanismos ecofisiológicos de respuesta para afrontar eventos de limitación hídrica del suelo. Las dos especies de pino presentaron un acoplamiento adecuado de las variables de intercambio gaseoso (g_s y A_N), pero con tasas diferentes entre especies. Las mayores tasas de A_N fueron en plantas inoculadas con *R. luteolus* y *S. luteus* en el tratamiento T2, sugiriendo que la micorrización controlada tuvo un efecto positivo, aún en condiciones limitantes. En general, las plantas de *P. canariensis* y *P. pinaster* presentaron un aumento en la *EUA* y *LMA* como ocurre en diferentes especies, especialmente durante la aclimatación a condiciones de bajas disponibilidad hídrica, sugiriendo que las dos especies poseen mecanismos de evasión a la sequía, y que la *LMA* en *P. canariensis* se ve particularmente favorecida por la colonización micorrícica de *S. luteus*.

Basados en los resultados de este estudio, se confirma el hecho de que no es posible definir la calidad de las plántulas de pino en los viveros forestales desde un punto de vista holístico, se hace recomendable el estudio de diferentes atributos morfológicos y fisiológicos, que incluyen parámetros físico-químicos que proporcionen información más exacta que pueda ser integrada para determinar la calidad de las plántulas producidas en los viveros forestales.



REFERENCIAS GENERALES

- Alarcón A, R Ferrera Cerrato. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* 17.
- Allen M, W Swenson, J Querejeta, L Egerton-Warburton, K Treseder. 2003. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology* 41:271-303.
- Andrade-Torres A. 2010. Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia* 61 (4): 84-90.
- Andrino A, A Morte, M Honrubia. Year. Caracterización y cultivo de tres cepas de *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet sobre sustratos basados en residuos agroalimentarios /Characterization and culture of three *Pleurotus eryngii* (Fries) Quélet strains on food and agriculture wastes. In *Anales de Biología*. 53 p.
- Aponte C. 2011. Interacciones planta-suelo en un bosque mediterráneo. *Revista Ecosistemas* 20.
- Augé R, K Schekel, R Wample. 1987. Rose leaf elasticity changes in response to mycorrhizal colonization and drought acclimation. *Physiologia Plantarum* 70:175-182.
- Augé RM. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Ávila-Flores IJ, JA Prieto-Ruíz, JC Hernández-Díaz, CA Wehenkel, JJ Corral-Rivas. 2014. Preconditioning *Pinus engelmannii* carr. seedlings by irrigation deficit in nursery.
- Bacon M. 2009. Water use efficiency in plant biology. John Wiley & Sons. 322 p.
- Barajas Rodríguez JE, A Aldrete, J Vargas Hernández, J López Upton. 2004. La poda química en vivero incrementa la densidad de raíces en árboles jóvenes de *Pinus greggii*. *Agrociencia* 38.
- Barea J, C Calvet, V Estaun, A Camprubi. 1996. Biological control as a key component in sustainable agriculture. *Plant and Soil* 185:171-172.
- Barros L, P Baptista, IC Ferreira. 2006. Influence of the culture medium and pH on the growth of saprobic and ectomycorrhizal mushroom mycelia. *Minerva Biotecnologica* 18:165-170.

- Bassani V, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2013. Spores of ectomycorrhizal fungi as inoculants for *Nothofagus pumilio* and exotic conifer seedlings in Patagonia, Argentina: their activity and conservation. *New Forests* 44:471-485.
- Beniwal RS, R Langenfeld-Heyser, A Polle. 2010. Ectomycorrhiza and hydrogel protect hybrid poplar from water deficit and unravel plastic responses of xylem anatomy. *Environmental and Experimental Botany* 69:189-197.
- Berrones G, C Oyarzún. 2013. Efecto de la transpiración sobre la escorrentía en dos tipos de bosque de la cordillera de la costa, sur de Chile. *Enfoque UTE* 4:18-34.
- Birchler Ta, A Royo, M Pardos. 1998. La planta ideal: revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. *Forest Systems* 7:109-121.
- Brundrett M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79:473-495.
- Brundrett M. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320:37-77.
- Brundrett M, N Ashwath, D Jasper. 1996a. Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. *Plant and Soil* 184:159-171.
- Brundrett M, N Bougher, B Dell, T Grove, N Malajczuk. 1996b. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra.
- Brundrett M, L Peterson, L Melville, H Addy, T McGonigle, G Shaffer, N Bougher, H Massicotte. 1994. Practical methods in mycorrhiza research: Based on a workshop organized in conjunction with the ninth North American Conference on mycorrhizae, . In. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. Mycologue Publications. 161 p.
- Brunner I, C Herzog, MA Dawes, M Arend, C Sperisen. 2015. How tree roots respond to drought. *Frontiers in plant science* 6:547.
- Bücking H, E Liepold, P Ambilwade. 2012. The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. In Plant science. InTech.
- Cairney JWG. 1992. Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. *Mycological Research* 96:135-141.

- Cano-Pineda A. 1998. Tamaño y calidad de planta de *Pinus greggii* Engelm., en dos sistemas de producción en vivero. Tesis Tesis de Maestría Montecillo-Texcoco, Edo. de México. Colegio de Postgraduados. . 80 p.
- Carmo ÉRd, CFd Silva, MSM Freitas, KB Lima, MA Martins. 2016. Production of Australian Cedar seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi in different types of containers. *Revista Árvore* 40:269-278.
- Carrera-Nieva A, G López-Ríos. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 10.
- Carvajal MJS, BACM Mera. 2010. Fertilización biológica: técnicas de vanguardia para el desarrollo agrícola sostenible. *Producción+ limpia* 5:77-96.
- Casierra-Posada F. 2007. Fotoinhibición: Respuesta fisiológica de los vegetales al estrés por exceso de luz. p. 114-123.
- Cassab GI, Y Sánchez-Guevara. 2011. Mecanismos de desarrollo y fisiología de raíces de plantas superiores.
- Casson S, JE Gray. 2008. Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist* 178:9-23.
- Cetina-Alcalá VM. 1997. Tres tipos de manejo en vivero de *Pinus greggii* Engelm. y su efecto en la calidad de la planta. Tesis Tesis de Doctorado. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Colegio de Postgraduados. 73 p.
- Claeys H, D Inzé. 2013. The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiology* 162:1768-1779.
- Corcuera L, C Maestro, E Notivol. 2005. La ecofisiología como herramienta para la selección de clones más adaptados y productivos en el marco de una selvicultura clonal con chopos. *Investigación Agraria: Sistema de Recursos Forestales* 14:394-407.
- Cordell CE, JH Owen, DH Marx. Year. Mycorrhizae nursery management for improved seedling quality and field performance. In Proceedings of the Intermountain Forest Nursery Association Meeting, Oklahoma City, OK. p. 105-115.
- Cosgrove D, M Holbrook. 2010. Water balance of plants. In: Taiz L, E Zeiger eds. *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. Sinauer Associates, Inc. Publishers p. 85-105.

- Cherle L, N Saibo, D Van Der Straeten. 2005. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends in biotechnology* 23:308-315.
- Chaves MM, JS Pereira, J Maroco, ML Rodrigues, CPP Ricardo, ML Osório, I Carvalho, T Faria, C Pinheiro. 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann Bot* 89:907-916.
- Chávez D, G Pereira, A Machuca. 2007. Crecimiento *in vitro* de cuatro especies de hongos ectomicorrícicos recolectados en plantaciones de *Pinus radiata*. *Agrociencia* 23:79-84.
- Chávez D, G Pereira, Á Machuca. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30:4-9.
- Chen Y, K Nara, Z Wen, L Shi, Y Xia, Z Shen, C Lian. 2015. Growth and photosynthetic responses of ectomycorrhizal pine seedlings exposed to elevated Cu in soils. *Mycorrhiza* 25:561-571.
- De La Parra PB, S Revilla Rodríguez, J Olaizola Suárez, J Cuesta Bachiller, OdR Salguero, A JA Saiz Rojo. Year. Propuesta de gestión de montes para optimizar la producción de hongos de interés comercial. In *Congresos Forestales*.
- de la Riva EG, M Olmo Prieto, H Poorter, JL Uberta Jiménez, R Villar Montero. 2016a. Leaf Mass per Area (LMA) and Its Relationship with Leaf Structure and Anatomy in 34 Mediterranean Woody Species along a Water Availability Gradient. 1-18.
- de la Riva EG, A Tosto, IM Pérez Ramos, CM Navarro Fernández, M Olmo, NP Anten, T Marañón, R Villar. 2016b. A plant economics spectrum in Mediterranean forests along environmental gradients: is there coordination among leaf, stem and root traits? *Journal of Vegetation Science* 27:187-199.
- Díaz G, R Flores, M Honrubia. 2009. Descripción de cultivos miceliares de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus grupo edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista mexicana de micología* 30:1-7.
- Díaz VL, AV Carmona, ML Camarasa, EH Lledó, VV Calzada. 2008. Plasticidad morfológica y fisiológica en plántulas de alcornoque, lentisco y pino canario inducidos por tratamientos de fertilización y sombreo. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*.
- Dickson A, AL Leaf, JF Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle* 36:10-13.

- Domínguez-Núñez JA, M Saiz, C Calderon, J Saiz de Omeñaca. 2013. Physiological effects of *Rhizopogon roseolus* on *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Systems* 22:568-572.
- Domínguez-Núñez J, R Planelles, JR Barreal, JS de Omeñaca. 2004. Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Forest Systems* 13:317-327.
- Domínguez J, R Planelles, J Rodrí. 2001. Estado hídrico y demanda de fotosíntesis de *Quercus ilex*, *Quercus faginea* y *Pinus halepensis* micorrizados artificialmente con *Tuber melanosporum* en vivero. *Congresos Forestales*.
- Duan X, DS Neuman, JM Reiber, CD Green, AM Saxton, RM Augé. 1996. Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* 47:1541-1550.
- Dubrovsky JG, GB North. 2002. Root Structure and Function. In: Nobel PS ed. *Cacti: biology and uses*. London, England. University of California Pr. p. 41-56.
- Duddridge J, A Malibari, D Read. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834.
- Duñabeitia MK, S Hormilla, JI Garcia-Plazaola, K Txarterina, U Arteche, JM Becerril. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11-18.
- Duryea ML. 1985. Evaluating seedling quality: importance to reforestation. In: Duryea ML ed. *Workshop held October 16-18. Proceedings: Evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major of major test*. Forest Research Laboratory, Oregon State University. Corvallis Oregon. USA.143 p.
- Eng F, M Gutiérrez-Rojas, E Favela-Torres. 2003. Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1. *Rev Iberoam Micol* 20:172-175.
- Escalona JM, J Flexas, H Medrano. 2000. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Functional Plant Biology* 27:87-87.

- Ewers BE. 2013. Understanding stomatal conductance responses to long-term environmental changes: a Bayesian framework that combines patterns and processes. *Tree physiology* 33:119-122.
- Fernández-Miranda E. 2007. Influencia de las condiciones culturales en el crecimiento y capacidad inoculativa de diferentes especies de hongos ectomicorrícicos. Tesis Licenciatura en Biología. Oviedo, España. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo. 30 p.
- Fernández M, A Royo, L Gil, JA Pardos. 2003. Effects of temperature on growth and stress hardening development of phytotron-grown seedlings of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *Annals of forest science* 60:277-284.
- Fernández ME, JE Gyenge. 2010. Técnicas en medición en ecofisiología vegetal: conceptos y procedimientos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina).
- Ferreira R, G Selles, H Silva, R Ahumada, I Muñoz, V Muñoz. 2006. Efecto del agua aplicada en las relaciones hídricas y productividad de la vid 'Crimson Seedless'. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 41:1109-1118.
- Fini A, P Frangi, G Amoroso, R Piatti, M Faoro, C Bellasio, F Ferrini. 2011. Effect of controlled inoculation with specific mycorrhizal fungi from the urban environment on growth and physiology of containerized shade tree species growing under different water regimes. *Mycorrhiza* 21:703-719.
- Finlay RD. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59:1115-1126.
- Fisher J, J Mexal. 1984. Nutrition management: a physiological basis for yield improvement. In *Seedling physiology and reforestation success*. Springer. p. 271-299.
- Fleming R, T Black, R Adams. 1996. Site preparation effects on Douglas-fir and lodgepole pine water relations following planting in a pinegrass-dominated clearcut. *Forest Ecology and Management* 83:47-60.
- Flexas J, H Medrano. 2002. Drought inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89:183-189.

- Fonseca ÉdP, SV Valéri, É Miglioranza, NAN Fonseca, L Couto. 2002. Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume, produzidas sob diferentes períodos de sombreamento. *Revista Árvore*:515-523.
- Frioni L. 1999a. Estrategias nutritivas y bionergéticas en los microorganismos. Efecto del ambiente. In: Frioni L ed. Procesos Microbianos. Argentina. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. p. 2-14.
- Frioni L. 1999b. Promoción del crecimiento vegetal. In: Frioni L ed. Procesos Microbianos. Argentina. Fundación Nacional de la Universidad de Río Cuarto. p. 1-9.
- Galmés J, J Flexas, R Savé, H Medrano. 2007a. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. *Plant and Soil* 290:139-155.
- Galmés J, H Medrano, J Flexas. 2007b. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist* 175:81-93.
- Gandini AMM, PH Graziotti, MJ Rossi, DCFS Graziotti, EMM Gandini, EdB Silva, C Ragonezi. 2015. Growth and Nutrition of Eucalypt Rooted Cuttings Promoted by Ectomycorrhizal Fungi in Commercial Nurseries. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 39:1554-1565.
- Gárate A, I Bonilla. 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. In: Azcón-Bieto J, M Talón eds. Fundamentos de Fisiología Vegetal. España. MacGraw Hill Interamericana. p. 113-130.
- García-Rodríguez J-L, J Pérez-Moreno, D Ríos-Leal, P Saez-Delgado, C Atala-Bianchi, M Sánchez-Olate, G Pereira-Cancino. 2017. *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus radiata* plantations in Chile. *Revista fitotecnia mexicana* 40:415-423.
- García-Rodríguez JL, JP Moreno, A Aldrete, VMC Alcalá, HV Huerta. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* 40:665-676.
- Garibay-Orijel R, E Morales-Marañón, M Domínguez-Gutiérrez, A Flores-García. 2013. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus*

- montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista mexicana de biodiversidad* 84:153-169.
- Garza-Ocañas F. 2014. Técnicas para el manejo de hongos ectomicorrícicos del bosque al laboratorio y viceversa. In: Garza-Ocañas F, JA Gurevara, MH Villalón, CA Carrillo eds. *Técnicas en el Manejo Sustentable de los Recursos Naturales*. Monterrey, Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Forestales, UANL. p. 72-121.
- González-Ochoa AI, J de Las Heras, P Torres, E Sánchez-Gómez. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Annals of forest science* 60:43-48.
- González-Rodríguez V, RM Navarro-Cerrillo, R Villar. 2011. Artificial regeneration with *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. by direct seeding and planting in southern Spain. *Annals of forest science* 68:637-646.
- Gracia-Alonso C, EP Ferrer, AS Plaza, SS Jorba. 2004. GOTILWA+: Un modelo de crecimiento forestal basado en procesos ecofisiológicos. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*.
- Grime JP. 2002. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. John Wiley & Sons.
- Guehl J, J Garbaye. Year. 1990. The effects of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. In *Annales des sciences forestières*. 551-563 p.
- Guehl J, D Mousain, G Falconnet, J Gruez. Year. 1990. Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water-use efficiency of *Pinus pinea* L seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. In *Annales des sciences forestières*. p. 91-100.
- Guerin-Laguette A, C Plassard, D Mousain. 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Canadian journal of microbiology* 46:790-799.
- Guerrero Forero E. 1996. *Micorrizas, recurso biológico del suelo*. Fondo FEN Colombia, Bogotá (Colombia).

- Guo X-Y, X-S Zhang, Z-Y Huang. 2010. Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. *Journal of Plant Ecology* 3:79-87.
- Gutschick VP, FW Wiegel. 1988. Optimizing the canopy photosynthetic rate by patterns of investment in specific leaf mass. *The American Naturalist* 132:67-86.
- Hanson PJ, JF Weltzin. 2000. Drought disturbance from climate change: response of United States forests. *Science of The Total Environment* 262:205-220.
- Harley JL, SE Smith. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, Great Britain. 483 p.
- Harrington CA. 1999. Forests planted for ecosystem restoration or conservation. *New Forests* 17:175-190.
- Heckman DS, DM Geiser, BR Eidell, RL Stauffer, NL Kardos, SB Hedges. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293:1129-1133.
- Hernandez MJ, F Montes, F Ruiz, G Lopez, P Pita. 2016. The effect of vapour pressure deficit on stomatal conductance, sap pH and leaf-specific hydraulic conductance in *Eucalyptus globulus* clones grown under two watering regimes. *Ann Bot* 117:1063-1071.
- Herralde Travería Fd. 2000. Estudio integral de las respuestas ecofisiológicas al estrés hídrico: caracterización de variedades de almendro. Universitat de Barcelona.
- Hetherington AM, FI Woodward. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424:901.
- Honrubia M. Year. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. In Anales del Jardín Botánico de Madrid. p. 133-144.
- Honrubia M, G Díaz, A Gutiérrez. Year. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. In Congreso Forestal Español. p.
- Honrubia M, P Torres, G Díaz, A Cano. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA.*
- Israelsson M, RS Siegel, J Young, M Hashimoto, K Iba, JI Schroeder. 2006. Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology* 9:654-663.
- Jarvis A, T Mansfield, WJ Davies. 1999. Stomatal behaviour, photosynthesis and transpiration under rising CO₂. *Plant, Cell & Environment* 22:639-648.

- Jha B, G Sharma, A Shukla. 2006. Growth behaviour ectomycorrhizal fungi with different physical factors *in vitro* conditions. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences* 8:339-343.
- Johnson JD, ML Cline. 1991. Seedling quality of southern pines. In Forest regeneration manual. Springer. p. 143-159.
- Johnson N, J Graham, F Smith. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytol* 135:575-585.
- Johnson NC, F Pflieger. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. *Mycorrhizae in sustainable agriculture* 54:71-99.
- Jones H. 2004. What is water use efficiency. *Water use efficiency in plant biology*:27-41.
- Katul GG, R Oren, S Manzoni, C Higgins, MB Parlange. 2012. Evapotranspiration: a process driving mass transport and energy exchange in the soil–plant–atmosphere–climate system. *Reviews of Geophysics* 50.
- Kavanagh K, J Zaerr. 1997. Xylem cavitation and loss of hydraulic conductance in western hemlock following planting. *Tree physiology* 17:59-63.
- Kerk NM, IM Sussex. 2012. Roots and Root Systems. *eLS*.
- Kipfer T, T Wohlgemuth, MG van der Heijden, J Ghazoul, S Egli. 2012. Growth response of drought-stressed *Pinus sylvestris* seedlings to single-and multi-species inoculation with ectomycorrhizal fungi. *PLoS ONE* 7:e35275.
- Kirkham MB. 2014. Principles of soil and plant water relations. Academic Press.
- Klironomos JN. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84:2292-2301.
- Lambers H, FSC III, NTJ Ponds. 1998. Plant Physiological Ecology. New York. Springer.
- Lambers H, H Poorter. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. In Advances in ecological research. Elsevier. p. 187-261.
- Landhäusser SM, TM Muhsin, JJ Zwiazek. 2002. The effect of ectomycorrhizae on water relations in aspen (*Populus tremuloides*) and white spruce (*Picea glauca*) at low soil temperatures. *Canadian Journal of Botany* 80:684-689.

- Landis T, R Tinus, S McDonald, J Barnett. 1990. Containers and growing media. Vol. 2 of The Container Tree Nursery Manual, Agricultural Handbook 674. Washington, DC, U.S.A. Department of Agriculture, Forest Service, 88 p.
- Landis TD, RG Nisley. 1990. The container tree nursery manual: Seedling nutrition and irrigation. Agriculture handbook. USA. 674 p.
- Lazarevic J, N Keca, A Martinovic. 2012. Mycorrhization of containerized *Pinus nigra* seedlings with *Suillus granulatus* under open field conditions. *Forest Systems* 21:498-507.
- Lazarević J, D Stojičić, N Keča. 2016. Effects of temperature, pH and carbon and nitrogen sources on growth of *in vitro* cultures of ectomycorrhizal isolates from *Pinus heldreichii* forest. *Forest Systems* 25:048.
- Lehto T, JJ Zwiazek. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21:71-90.
- LePage B, R Currah, R Stockey, G Rothwell. 1997. Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. *American Journal of Botany* 84:410-410.
- Li C, K Wang. 2003. Differences in drought responses of three contrasting *Eucalyptus microtheca* F. Muell. populations. *Forest Ecology and Management* 179:377-385.
- Makita N, Y Hirano, T Yamanaka, K Yoshimura, Y Kosugi. 2012. Ectomycorrhizal fungal colonization induces physiological changes in *Quercus serrata* leaves and roots. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 175:900-906.
- Manero-Colín IN, MdL Acosta-Urdapilleta, E Montiel A, FA Medrano-Vega. 2012. Otros hongos comestibles. 5.4. Cultivo de *Lentinula edodes* en aserrín de jacarandas con nutrientes In: Sanchez VJE, G Mata eds. Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica. Tapachula, Chiapas, México. Colegio de la Frontera Sur. p. 229-239.
- Marks GC, TT Kozlowski. 1973. Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology. New York, USA. Academic Press.
- Martín-Benito D, M Del Río, I Heinrich, G Helle, I Canellas. 2010. Response of climate-growth relationships and water use efficiency to thinning in a *Pinus nigra* afforestation. *Forest Ecology and Management* 259:967-975.

- Martínez-Nevárez LE, H Sarmiento López, JÁ Sigala Rodríguez, S Rosales Mata, JB Montoya Ayón. 2015. Respuesta a la inoculación inducida de *Russula delica* Fr. en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 7:108-117.
- Martínez-Reyes M, J Pérez-Moreno, L Villarreal-Ruiz, R Ferrera-Cerrato, B Xoconostle-Cázares, JJ Vargas-Hernández, M Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quéf. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:183-192.
- Martínez DB, C Barroetaveña, M Rajchenberg. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque (Valdivia)* 28:226-233.
- Marx D, J Ruehle, C Cordell. 1991. 17 Methods for Studying Nursery and Field Response of Trees to Specific Ectomycorrhiza. In *Methods in microbiology*. Elsevier. p. 383-411.
- Marx DH, WC Bryan, CB Davey. 1970. Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. *Forest Science* 16:424-431.
- Marx DH, SB Maul, CE Cordell. 1992. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In *Frontiers in industrial mycology*. Springer. p. 78-98.
- Medrano H, J Bota, J Cifre, J Flexas, M Ribas-Carbó, J Gulías. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas (Esp)*.
- Medrano H, J Escalona, J Bota, J Gulias, J Flexas. 2002. Regulation of photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot* 89:895-905.
- Medrano H, J Flexas, J Galmés. 2009. Variability in water use efficiency at the leaf level among Mediterranean plants with different growth forms. *Plant and Soil* 317:17-29.
- Meiri A, Z Plaut, D Shimshi. 1975. The use of the pressure chamber technique for measurement of the water potential of transpiring plant organs. *Physiologia Plantarum* 35:72-76.
- Melzack R, B Bravdo, J Riov. 1985. The effect of water stress on photosynthesis and related parameters in *Pinus halepensis*. *Physiologia Plantarum* 64:295-300.

- Michelozzi M, F Loreto, R Colom, F Rossi, R Calamassi. 2011. Drought responses in Aleppo pine seedlings from two wild provenances with different climatic features. *Photosynthetica* 49:564-572.
- Miller O, SL Miller, JG Palmer. 1983. Description and identification of selected mycorrhizal fungi in pure culture. *Mycotaxon* 18:457-481.
- Mooney HA, EL Dunn. 1970. Convergent evolution of Mediterranean-climate evergreen sclerophyll shrubs. *Evolution* 24:292-303.
- Morte A, G Díaz, P Rodríguez, J Alarcón, M Sánchez-Blanco. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* 44:263-267.
- Mousain D, P Matumoto-Pintro, H Quiquampoix. 1997. Le rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée des arbres forestiers. *Revue forestière française* 49:67-81.
- Nelsen CE. 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.
- Newsham K, A Fitter, A Watkinson. 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution* 10:407-411.
- Niinemets Ü. 1999. Research review. Components of leaf dry mass per area–thickness and density–alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytol* 144:35-47.
- Niinemets Ü. 2001. Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology* 82:453-469.
- Nouhra ER, AG Becerra. 2001. Síntesis micorrícica de *Suillus granulatus* (Eumycota) y plantines de *Pinus elliottii* (Pinaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 36:209-215.
- Oliet PJA, GR Planelles, AM López, CF Artero. 2000. Efecto de la fertilización en vivero y del uso de protectores en plantación sobre la supervivencia y el crecimiento durante seis años de una repoblación de *Pinus halepensis*. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*: 69-77.
- Ortega U, M Dunabeitia, S Menendez, C Gonzalez-Murua, J Majada. 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 Carrión JA. 2007. Perspectiva fisiológica en la producción y mejora del eucalipto:(con énfasis en *Eucalyptus globulus* Labill).
- Parladé J, J Pera, IF Alvarez. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245.
- Pastor-Sáez JN. 1999. Utilización de sustratos en viveros. *Terra Latinoamericana* 17.
- Patishtán Pérez J, R Rodríguez García, F Zavala García, D Jasso Cantú. 2010. Conductancia estomática y asimilación neta de CO₂ en sábila (*Aloe vera* Tourn) bajo sequía. *Revista fitotecnia mexicana* 33:305-314.
- Peña-Rojas K, X Aranda, I Fleck. 2004. Stomatal limitation to CO₂ assimilation and down-regulation of photosynthesis in *Quercus ilex* resprouts in response to slowly imposed drought. *Tree physiology* 24:813-822.
- Peñuelas RJL, BL Ocaña. 2000. Cultivo de plantas forestales en contenedor principios y fundamentos.
- Pera J, J Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales* 14:419-433.
- Pereira G, J Campos, D Chávez, L Anabalón, C Arriagada. 2014. Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrícico *Lactarius* aff. *deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. *Quebracho* 22:30-39.
- Pereira G, J Herrera, A Machuca, M Sánchez. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28:215-219.
- Pérez-Moreno J. 1995. La simbiosis ectomicorrízica y su importancia ecológica. In: Ferrera CR, J Pérez-Moreno eds. Agroclimatología, elemento útil en la agricultura sustentable. Texcoco, México. Colegio de Postgraduados. p. 200-207.
- Pérez-Moreno J. 2007. Biotecnología de los hongos ectomicorrízicos. In: Díaz-Franco A, N Mayek-Pérez eds. La biofertilización como tecnología sostenible. México. Plaza y Valdés. p. 93-110.
- Pérez-Moreno J, DJ Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29:239-247.

- Pirt SJ. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications.
- Pita G, B Gielen, D Zona, A Rodrigues, S Rambal, IA Janssens, R Ceulemans. 2013. Carbon and water vapor fluxes over four forests in two contrasting climatic zones. *Agricultural and Forest Meteorology* 180:211-224.
- Podestá L, E Sánchez, R Vallone, JA Morábito. 2010. Efecto del riego deficitario controlado sobre el crecimiento vegetativo en plantaciones jóvenes de cerezo (*Prunus avium* L.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 42.
- Poorter H, Ü Niinemets, L Poorter, IJ Wright, R Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (*LMA*): a meta-analysis. *New Phytologist* 182:565-588.
- Powell J, J Klironomos. 2007. The ecology of plant-microbial mutualisms. In: Paul EA ed. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition). Canada. Elsevier. p. 257-281.
- Prieto-Ruiz JÁ, RJ Almaraz Roldán, JJ Corral-Rivas, A Díaz Vázquez. 2012. Efecto del estrés hídrico en *Pinus cooperi* Blanco durante su preacondicionamiento en vivero. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3:19-28.
- Prieto R, J García-Rodríguez, B Mejía, A Huchín, V Aguilar. 2009. Producción de planta del género *Pinus* en vivero en clima templado frío. Durango, México. INIFAP. 48 p.
- Prieto Ruiz J, D Calleros, JdJ Návaz Chaidez, E Cornejo Oviedo. 2004. Factores que influyen en la producción de planta de *Pinus cooperi* blanco en vivero. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 10.
- Prieto Ruiz JÁ, JL García Rodríguez, JC Monarrez González, RE Madrid Aispuro. 2012. Producción de planta del género *Pinus*. Folleto Técnico No. 50. Durango, Dgo. México. INIFAP. 40 p.
- Quiroz Marchant I, E García Rivas, M González Ortega, P Chung Guin-Po, H Soto Guevara. 2009. Micorrización. In: Quiroz Marchant I, E García Rivas, M González Ortega, P Chung Guin-Po, H Soto Guevara eds. Vivero forestal: Produccion de plantas nativas a raíz cubierta. Concepción, Chile. Centro Tecnológico de la Planta Forestal. INFOR. p. 63-71.
- Radin J, R Bressan, MC Drew, PM Hasegwa. 2010. Responses and adaptations to abiotic stress. In: Taiz L, E Zeiger eds. Plant Physiology. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. Sinauer Associates, Inc. Publishers p. 755-782.

- Raggio M, N Moro. 2008. Uso de la cámara de presión y los psicrómetros a termocupla en la determinación de las relaciones hídricas en tejidos vegetales.
- Ramírez-Contreras A, DA Rodríguez-Trejo. 2004. Efecto de calidad de planta, exposición y micrositio en una plantación de *Quercus rugosa*. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. 10:5-11.
- Raven JA. 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* 153:371-386.
- Read D, R Boyd. 1986. Water relations of mycorrhizal fungi and their host plants. *Water, fungi and plants. Cambridge University Press, Cambridge*:pp. 287-303.
- Read DJ, J Perez-Moreno. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist* 157:475-492.
- Redecker D. 2002. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. In *Diversity and Integration in Mycorrhizas*. Springer. pp. 67-73.
- Redecker D, R Kodner, LE Graham. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920-1921.
- Reich P, M Tjoelker, M Walters, D Vanderklein, C Buschena. 1998. Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* 12:327-338.
- Reich P, M Walters, D Ellsworth. 1992. Leaf life span in relation to leaf, plant, and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological monographs* 62:365-392.
- Renninger HJ, NJ Carlo, KL Clark, KVR Schafer. 2015. Resource use and efficiency, and stomatal responses to environmental drivers of oak and pine species in an Atlantic Coastal Plain forest. *Frontiers in plant science* 6:297.
- Rentería-Chávez MC, J Pérez-Moreno, VM Cetina-Alcalá, R Ferrera-Cerrato, B Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista argentina de microbiología* 49:93-104.
- Rincón A, IF Alvarez, J Pera. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-271.
- Rincón A, IF Álvarez, J Pera. 1999. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northeastern Spain. *Mycorrhiza* 8:271-276.

- Rincón A, J Parladé, J Pera. 2005. Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Annals of forest science* 62:817-822.
- Ritchie GA. 1984. Assessing seedling quality. In: Duryea ML, TD Landis eds. Forest Nursery Manual: production of bareroot seedlings. . The Netherlands. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. Springer Science & Business Media. p. 243-259.
- Ritchie GA, TM Hinckley. 1975. The pressure chamber as an instrument for ecological research. In Advances in ecological research. Elsevier. pp. 165-254.
- Roelfsema MRG, R Hedrich. 2005. In the light of stomatal opening: new insights into ‘the Watergate’. *New Phytologist* 167:665-691.
- Salzer P, A Hager. 1991. Sucrose Utilization of the Ectomycorrhizal Fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* Depends on the Cell Wall-bound Invertase Activity of their Host *Picea abies*. *Plant Biology* 104:439-445.
- Salle A, H Ye, A Yart, F Lieutier. 2008. Seasonal water stress and the resistance of *Pinus yunnanensis* to a bark-beetle-associated fungus. *Tree physiology* 28:679-687.
- Sánchez-Díaz M, M Honrubia. 1994. Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. In Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Springer. p. 167-178.
- Sánchez F, M Honrubia, P Torres. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:127-134.
- Sánchez F, M Honrubia, P Torres. 2001. Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie* 22:243-258.
- Sánchez JE, DJ Royse. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. *El colegio de la frontera sur y LIMUSA, México*.
- Santelices R, S Espinoza, N Brunel, G Palfner. 2012. Effect of the geographical origin, culture media, and pH on the growth dynamic of the edible ectomycorrhizal mushroom *Suillus luteus*. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura* 39:369-376.
- Schölander PF, ED Bradstreet, E Hemmingsen, H Hammel. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148:339-346.

- Schüßler A, D Schwarzott, C Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.
- Selosse M-A, F Le Tacon. 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* 13:15-20.
- Selles SGv, ER Ferreyra. 2006. Sistema de Monitoreo de Planta. In: Maldonado I, S Aravena eds. Redes de estaciones meteorológicas automáticas y sus aplicaciones productivas. Boletín INIA. p. 265-286.
- Siam A, K Radoglou, B Noitsakis, P Smiris. 2008. Physiological and growth responses of three Mediterranean oak species to different water availability regimes. *Journal of arid environments* 72:583-592.
- Siddiqui ZA, Pichtel. 2008. Mycorrhizae: An Overview. In: Z SA, AM S, K F eds. Mycorrhizae: Sustainable agriculture and Forestry Springer Science. p. 1-35.
- Silva M, R Rubilar, J Espinoza, M Yáñez, V Emhart, JJ Quiroga. 2017. Respuesta en parámetros de intercambio gaseoso y supervivencia en plantas jóvenes de genotipos comerciales de *Eucalyptus* spp sometidas a déficit hídrico. *Bosque (Valdivia)* 38:79-87.
- Smith SE, DJ Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. New York, USA. Academic Press. 769 p.
- Solarte ME, LV Pérez, LM Melgarejo. 2010. Ecofisiología Vegetal. In: Melgarejo LM ed. Experimentos en Fisiología Vegetal. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p. 137-166.
- Steffen GPK, RB Steffen, RMD Morais, CW Saldanha, J Maldaner, TM Loiola. 2017. *Parapiptadenia rigida* mycorrhization with spores of *Scleroderma citrinum*. *CERNE* 23:241-248.
- Subramanian K, C Charest, L Dwyer, R Hamilton. 1995. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytologist* 129:643-650.
- Tagu D, F Lapeyrie, F Martin. 2002. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil* 244:97-105.
- Taiz L, E Zeiger. 2010. Plant Physiology. U.S.A. Sinauer Associates.
- Tateishi T, K Yokoyama, N Kohno, H Okabe, T Marumoto. 2003. Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. *Soil science and plant nutrition* 49:641-645.

- Taylor AF, I Alexander. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-112.
- Tedersoo L, TW May, ME Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217-263.
- Teskey RO, D Whitehead, S Linder. 1994. Photosynthesis and carbon gain by pines. *Ecological Bulletins*:35-49.
- Thompson BE. 1985. Seedling morphological evaluation: what you can tell by looking. In: Duryea ML ed. Proceedings: evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major test. Oregon State University, Forest Research Laboratory. Corvallis, Oregon. p. 59 -71.
- Tinus RW, SE McDonald. 1979. How to grow tree seedlings in containers in greenhouses. General Technical Report RM-60 Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station Forest Service. USDA. 145 p.
- Torres MP. 1992. Estudio de las ectomicorrizas de pino carrasco (*Pinus Halepensis* Miller). Tesis Doctorado en Ciencias Biológicas. Murcia, España. Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Murcia, Facultad de Biología. 165 p.
- Torres P, M Honrubia. 1993. Descripción de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 18:163-170.
- Trappe JM. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology* 15:203-222.
- Trappe JM. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*:5-25.
- Valdés RM, E Ambriz Parra, A Camacho Vera, AM Fierros González. 2010. Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 1:53-63.
- Valencia AS, RJ Jiménez, FG Flores. 2004. La colonización del medio terrestre por las plantas. *Ciencias*.
- Varela L, D Trejo. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoologica Mexicana*:39-51.

- Vázquez-García A, G Santiago-Martínez, A Estrada-Torres. Year. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. In *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*. p. 1-15.
- Vico G, S Manzoni, S Palmroth, M Weih, G Katul. 2013. A perspective on optimal leaf stomatal conductance under CO₂ and light co-limitations. *Agricultural and Forest Meteorology* 182:191-199.
- Villar-Salvador P. 2003. Importancia de la calidad de planta en los proyectos de revegetación. In: Rey Benayas JM, T Espigares Pinilla, JM Nicolau Ibarra eds. *Restauración de ecosistemas mediterráneos*. Universidad de Alcalá/Asociación Española de Ecología Terrestre. p. 65-86.
- Villar-Salvador P, JL Peñuelas, DF Jacobs. 2013. Nitrogen nutrition and drought hardening exert opposite effects on the stress tolerance of *Pinus pinea* L. seedlings. *Tree physiology* 33:221-232.
- Villarreal L, J Perez-Moreno. 1989. Wild edible fungi from Mexico, an integral approach. *Micol. Neotrop. Appl* 2:77-114.
- Vogt K, H Asbjornsen, A Ercelawn, F Montagnini, M Valdes. 1997. Roots and mycorrhizas in plantation ecosystems. In: Nambiar EKS, AG Brown eds. *Management of Soil, nutrientes and water in tropical plantation forest*. Camberra, Australia. ACIAR. 571 p.
- Voroney RP. 2006. Soil microbiology, ecology and biochemistry. In: Paul EA ed. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Canada. Academic Press, Elsevier. p.25-49.
- Webster J, R Weber. 2007. *Introduction to fungi*. United Kingdom Cambridge University Press.
- Werner C, RJ Ryel, O Correia, W Beyschlag. 2001. Effects of photoinhibition on whole plant carbon gain assessed with a photosynthesis model. *Plant, Cell & Environment* 24:27-40.
- Westoby M, DS Falster, AT Moles, PA Vesk, IJ Wright. 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:125-159.
- Wilcox H. 1996. Mycorrhizae. In *Plant roots-the hidden half*. New York. Marcel Dekker. p. 149-174.
- Wright D, D Read, J Scholes. 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* 21:881-891.

- Wright IJ, PB Reich, M Westoby, DD Ackerly, Z Baruch, F Bongers, J Cavender-Bares, T Chapin, JH Cornelissen, M Diemer. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428:821.
- Yang Y, C Li. 2016. Photosynthesis and growth adaptation of *Pterocarya stenoptera* and *Pinus elliottii* seedlings to submergence and drought. *Photosynthetica* 54:120-129.
- Yu G-R, J Zhuang, Z-L Yu. 2001. An attempt to establish a synthetic model of photosynthesis-transpiration based on stomatal behavior for maize and soybean plants grown in field. *Journal of plant physiology* 158:861-874.
- Zavala Md, I Urbieto, R Bravo de la Parra, O Angulo. 2005. Modelos de proceso de la producción y dinámica del bosque Mediterráneo. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 14:482-496.
- Zweifel R, K Steppe, FJ Sterck. 2007. Stomatal regulation by microclimate and tree water relations: interpreting ecophysiological field data with a hydraulic plant model. *Journal of Experimental Botany* 58:2113-2131.

