

INFLUENCIA DE LAS SUSTANCIAS LIQUÉNICAS DE *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf SOBRE LA GERMINACIÓN, CRECIMIENTO Y MICORRIZACIÓN EN PLANTAS DE *Pinus sylvestris* L. CULTIVADAS EN VIVERO.

S. REVENGA GARCIA; R.L. FERNÁNDEZ Y SUAREZ; M.A. MONSÓ SENABRE.

ESCUELA UNIVERSITARIA DE INGENIERIA TÉCNICA FORESTAL. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID. CIUDAD UNIVERSITARIA S/N, 28040 MADRID.

RESUMEN

Es un hecho constatable, el efecto alelopático que diversas sustancias líquénicas ejercen sobre hongos y plantas superiores, disminuyendo su velocidad de germinación, crecimiento o inhibiendo incluso la formación de micorrizas. Con la realización del presente estudio se pretende conocer la influencia que ejercen las sustancias líquénicas de *Pseudevernia furfuracea* sobre la germinación, crecimiento, desarrollo y formación de micorrizas en plántulas de *Pinus sylvestris*, tratadas con el hongo micorrízico *Lactarius deliciosus*, con el fin de establecer unas posibles pautas de comportamiento general. Los resultados obtenidos en la fase de germinación, delataron una menor potencia germinativa y un elevado porcentaje de marras en la población que únicamente fue liquenizada; así pues en la segunda fase de estudio, también se observó en esta misma población un desarrollo bastante escaso a todos los niveles, si bien cabe apreciar, en la población conjunta de líquenes y micorrizas un desarrollo por encima de lo normal, con respecto a la población testigo, y algo inferior a la población micorrizada, no viéndose inhibido el proceso de micorrización, aunque sí se aprecia cierta disminución en el mismo.

P.C.: Sustancias líquénicas, micorrizas, inhibición, germinación, crecimiento.

SUMMARY

It is an evident fact that various lichenic substances exert an allelopathic effect on fungus and evolutioned plants, by reducing germination speed rates, growth or even inhibiting the formation of mycorrhizae. This survey tries to find out how much influence is exerted by *Pseudevernia furfuracea* lichenic substances on germination, growth, development and formation of mycorrhizae on *Pinus sylvestris* seedlings which have been previously treated with the mycorrhizic fungus known as *Lactarius deliciosus*. This survey goal is to determine some possible, general behaviour guidelines. Results outcoming from the germination stage revealed, a weaker germination power and a high percentage of failures among those individuals which were only lichenized. Thus, at the second survey failures, it was also noticed the fact that these same individuals developed rather poorly at all levels. Nevertheless, an over average development among the joint population of lichens and mycorrhizae regarding the control population, was appreciated. It was otherwise found slightly lower when compared to mycorrhized population. The process of mycorrhization does not seem to have been inhibited, but in any case it seems to be really diminished.

K.W.: Lichenic substances, mycorrhizae, inhibition, germination, growth.

INTRODUCCIÓN

Es sumamente frecuente encontrar en nuestros ecosistemas forestales, interacciones simbióticas originadas entre diversos organismos; destacaremos de un modo especial aquellas relaciones que se establecen entre diversos tipos de hongos y otros organismos vegetales, tales como algas, y las asociaciones que los hongos establecen con las raíces, dando lugar respectivamente a líquenes y micorrizas.

Se define micorriza, como la asociación simbiótica entre el micelio de un hongo y las raíces cortas de una planta (HAWKSWORTH et al., 1983). Por otra parte, un líquen se define actualmente como una asociación simbiótica estable entre un hongo (micobionte) y un simbiote fotosintético (fotobionte), cuyo resultado es un talo estable con una estructura y fisiología específica (MARCANA, 1985).

Basándonos principalmente en el estudio realizado por BROWN & MIKOLA (1974), acerca de la influencia que ejercían las sustancias líquénicas de *Cladonia alpestris* sobre la germinación y desarrollo de plantas micorrizadas de *Pinus sylvestris*, procederemos a realizar un estudio de similares características, con el objetivo principal de estudiar y analizar los dos tipos de simbiosis diferentes presentes en la planta. Estableceremos además una serie de objetivos genéricos tales como, el estudio en plántulas de *Pinus sylvestris*,

para ambas simbiosis, de la evolución de los procesos de germinación, crecimiento y desarrollo así como el estudio de la influencia que ejercen las sustancias liquénicas (fenoles liquénicos) sobre la mayor o menor formación de micorrizas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La producción de las plantas se realizó a partir de semillas de *Pinus sylvestris* procedentes de la Sierra de Guadarrama. El material biológico utilizado (talos fruticosos de *Pseudevernia furfuracea* y carpóforos maduros de *Lactarius deliciosus*) fue recolectado en el monte "Pinar de Valsaín" (Segovia), sobre sustrato ácido (corteza y suelo). El sustrato utilizado ha sido turba rubia de *Sphagnum*.

Se van a analizar cuatro poblaciones distintas de plantas de *Pinus sylvestris*: una población testigo o control; una población a la que le será adicionada una solución de riego que contiene las sustancias liquénicas de *Pseudevernia furfuracea*; una población a la que se le añadirá un inóculo esporal producido a partir de carpóforos de *Lactarius deliciosus*, con el objeto de micorrizarla; y por último tendremos una población a la que se procederá a micorrizar y a liquenizar. Los contenedores elegidos, fueron los correspondientes al modelo Forespot 300; se trata de un envase troncopiramidal de 5x5 cm de sección máxima y 18 cm de altura, presenta dos costillas interiores y está abierto por su parte inferior, tiene una capacidad máxima de 300 ml y se presenta en bloques de 50 alvéolos. Se sembraron 75 alvéolos por cada población, lo que representa un total de 300 plantas. A lo largo de todo el tiempo que duró el estudio, se llevaron a cabo cuatro tandas para añadir la solución de riego liquenizada, y el inóculo esporal, realizándose la primera tanda en el momento de la siembra.

La solución de riego liquénica se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por VICENTE (1.983), mediante la cual, a partir de los talos secos de los líquenes y tras varios procesos de maceración, desecación y centrifugado, se obtiene un finísimo polvo amarillento que se mezcla con agua destilada obteniéndose de este modo una solución de riego. Posteriormente se procedió a regar cada alveolo con una cantidad de solución de riego de 20-22 ml.

El inóculo esporal se elaboró a su vez siguiendo el método descrito por CASTELLANO & MOLINA (1.989), según las indicaciones dadas por HONRUBIA et al. (1.992), por el cual se obtuvo una suspensión esporal homogénea tras triturar los carpóforos maduros y mezclarlos con agua destilada; se añadió dicha solución a razón de 60 ml por cada alveolo.

Se han distinguido dos fases de estudio diferentes: En la primera se llevó a cabo todo el estudio del proceso de germinación, donde se evaluó la potencia germinativa, el porcentaje de marras, así como diversos parámetros relacionados con el tiempo invertido en germinar. La segunda parte tuvo como objetivo el estudio del crecimiento y desarrollo de las plantas durante los primeros ocho meses de vida, para ello se realizaron cuatro tandas de extracciones diferentes (en cada extracción se tomaron ocho plantas por cada población), separadas en el tiempo, con el fin de determinar la evolución a lo largo del mismo de diversos parámetros tanto morfológicos como fisiológicos: altura, longitud de la raíz, diámetro del cuello de la raíz, peso, porcentaje de micorrización, presencia de fenoles liquénicos en la planta...

La determinación del porcentaje de micorrización o de raíces cortas micorrizadas se realizó siguiendo el método propuesto por PHILLIPS & HAYMAN (1.970), de tinción con Azul Tripán. Asimismo la determinación de la cantidad de sustancia liquénica se realizó siguiendo una metodología experimental de valoración de fenoles totales con cloruro férrico, (LAAKSO et al. 1.952) mediante la cual se determina una valoración espectrofotométrica midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 475 nm y hallando la concentración de fenoles totales presentes en la planta mediante una recta de calibración hallada con ácido salicílico (patrón estándar).

RESULTADOS

En la fase de estudio, encargada de analizar todo el proceso germinativo, se observa, como se muestra en la tabla 1, que tanto la potencia germinativa más baja, como el porcentaje de marras más alto, lo presenta la población liquenizada. Por otra parte, en esta misma población, se observa (figura 1), como, la germinación de sus semillas sigue una evolución más ralentizada en el tiempo, demostrada por la curva acumulativa de germinación que se presenta como la más tumbada, esto es, con la menor pendiente. El resto de las poblaciones presentan potencias germinativas superiores a la indicada en el lote de semillas, que la situaba en un 80%. De igual modo presentan porcentajes de marras muy bajos o incluso nulos.

En el estudio del crecimiento y desarrollo, (tabla 2), se observa de igual modo, que las plantas que denotan un menor crecimiento en altura, crecimiento radical, menor peso...son las pertenecientes a la población liquenizada; se trata pues de plantas con un escaso vigor vegetativo, y con un crecimiento y desarrollo anómalo, situado por debajo de lo normal. Por otra parte es en esta población donde el análisis de fenoles presentes en la raíz arroja los mayores resultados. Esta alta concentración de fenoles es fruto de la suma de los fenoles que la

planta posee como propios y de los fenoles liquénicos adicionados mediante la solución de riego.

Por el contrario aquella población que presenta un destacado crecimiento y desarrollo, por encima de lo normal, es la población que fue micorrizada. La población liquenizada y micorrizada también presentan un desarrollo bastante aceptable, situado de igual modo por encima de lo normal, aunque algo inferior con respecto a la población que sólo fue micorrizada.

Con respecto al porcentaje de micorrización (figura 2), se obtuvo para la población que sólo fue micorrizada una tasa del 40% como máximo, porcentaje bastante aceptable si se tiene en cuenta el tiempo que duró el estudio. Para la población conjunta de micorriza y líquen, se obtuvo un porcentaje del 30%, viéndose reducido solo en un 10% con respecto al anterior, por acción de los fenoles liquénicos, ya que como figura en la tabla 2, esta última población presenta unas concentraciones algo más elevadas que la población que sólo fue micorrizada, hecho bastante evidente, pues se le ha adicionado dos tipos de soluciones de riego diferentes, que contenían sustancias fenólicas (pero de distinto tipo), aunque si bien es cierto, a la luz de los resultados, que si la población de líquen y micorriza debería presentar la concentración más alta de fenoles, (ya que como se ha mencionado anteriormente, ésta sería el resultado de la suma de los fenoles presentes en la planta, más los que adicionamos nosotros mediante el inóculo), esto no es así, ya que los fenoles liquénicos al ser inoculados en plantas micorrizadas, pierden de algún modo parte de su efecto alelopático, al ser contrarrestados por la acción beneficiosa de las micorrizas. Como se observa en la figura 3, la concentración de fenoles en esta última población es alto, pero no conlleva efectos tan nocivos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las cuatro poblaciones ensayadas han mostrado diferentes comportamientos, tanto en el estudio germinativo, como en el periodo de crecimiento y desarrollo. La población que fue liquenizada ha presentado en todos los análisis, el crecimiento y desarrollo más débil y escaso, asimismo presentó una potencia germinativa del 54,7%, potencia situada muy por debajo de la indicada en el lote de semillas, que la situaba en el 80%. Como se deduce de estos datos, las sustancias fenólicas de *Pseudevernia furfuracea*, si bien en principio no provocan la total inhibición en el proceso germinativo, si producen una cierta disminución en el mismo, observándose además que, durante el tiempo que duró esta primera fase de estudio, se contabilizó un porcentaje de marras bastante elevado (36%), lo cual nos indica que aunque el efecto inhibitorio se produce únicamente de manera parcial, si se producen plantas de escaso vigor vegetativo con una alta probabilidad de muerte prematura.

La población que fue micorrizada con el hongo *Lactarius deliciosus*, presentó una potencia germinativa del 98,7%, la más alta obtenida en el ensayo. De este análisis se puede extraer como conclusión, el hecho de que la micorrización, aunque sea en inicio, favorece la germinación, aumentando la potencia germinativa y dando lugar a plantas vigorosas y con un porcentaje de marras nulo. Así es, estas plantas micorrizadas presentan los índices más elevados de crecimiento y desarrollo, lo cual viene a demostrar una vez más la gran conveniencia de micorrizar plantas en vivero, para su posterior asentamiento en monte.

Pero sin duda los datos más relevantes son los que obtenemos de la población que fue liquenizada y micorrizada conjuntamente. Esta población presentó una potencia germinativa del 96%, un porcentaje nulo de marras y unos resultados sobre crecimiento y desarrollo algo inferiores con respecto a la población micorrizada pero por encima de los resultados obtenidos con la población testigo. Como hemos visto los fenoles liquénicos de *Pseudevernia furfuracea*: atranorina, cloroatranorina, ácido olivetórico, ácido lecanórico y ácido fisódico (CULBERSON (1.969); GARCIA et al. (1.985)), no producen la inhibición total de ninguno de los procesos fisiológicos ni morfológicos de la planta, pero si produce una disminución en los mismos bastante notable, pero en la población que fue micorrizada y liquenizada, esta disminución es poco relevante a todos los niveles, si bien cabe destacar de algún modo la disminución acaecida en el porcentaje de micorrización que lo sitúa en un 30%, porcentaje bastante aceptable, solamente reducido en un 10% con respecto a la población micorrizada.

Podemos extraer como conclusión final, que los fenoles liquénicos de *Pseudevernia furfuracea* inoculados en plantas de *Pinus sylvestris*, provocan una reducción bastante considerable en la potencia germinativa, alta tasa de mortalidad y plantas débiles y de escaso desarrollo; pero si estas mismas sustancias se le inoculan a plantas que están o van a ser micorrizadas, este efecto semi-alelopático, se atenúa de tal forma que la planta sigue manteniendo un excelente comportamiento, aunque algo más reducido. Nos atreveremos a decir entonces, que otro de los posibles efectos beneficiosos que puede conllevar el hecho de micorrizar, es que de esta manera no solo nos procuramos plantas de calidad, sino plantas que puedan combatir el efecto nocivo o alelopático que puedan ejercer diversas sustancias de estas mismas características presentes en las especies vegetales acompañantes.

BIBLIOGRAFÍA

- BROWN, R.T.; MIKOLA, P.; (1.974). *The influence of fruticose soil lichens upon the mycorrhizae and seedling growth of forest trees*. Acta Forestalia Fennica. Vol. 141. Helsinki. pp: 1-23
- CASTELLANO, M.A.; MOLINA, R.; (1.989). *Mycorrhizae*. Vol. 5. The Biological Component: Nursery Pess and Mycorrhizae. Agric. Handbook 674. USDA. Forest Service. Washington. pp: 101-171.
- CULBERSON, C.F.; (1.969). *Chemical and botanical guide to lichen products*. The University of North Carolina Press. Chapel Hill.
- GARCIA, E.; GONZALEZ, A.; VICENTE, C.; (1.985). *Phenolics content of Pseudevernia furfuracea*. Heyday Books. University Ave., Berkeley 45(2): 153-158
- HONRUBIA, M.; TORRES, P.; DIAZ, G.; CANO, A.; (1.992). *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Proyecto Lucdeme VIII. Ministerio Nacional de Agricultura, Pesca y Alimentación. ICONA. pp: 34-35
- HAWSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C.; AINSWORTH, G.C.; (1.983). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. CMI. KEW.
- LAAKSO, P.V.; GOSTAFSSON, M.; VIRTANEN, E.O.; (1.952). *The antibiotic activity and colour reaction with ferric chlororide of some Finnish lichens*. The Research Laboratory, Lääketehtas, Helsinki. pp: 1-14
- MARCANA, V.; (1.985). *Introducción al estudio de los líquenes y su clasificación*. Colección Flora líquénica de los Andes. Vol. I. pp: 17-32
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S.; (1.970). *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection*. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.
- VICENTE, C.; (1.983). *Fisiología de las sustancias líquénicas*. Editorial Alambra. Madrid.

Población	Testigo	Liquenizada	Micorrizada	Liquen +Micorr.
G (%)	86,7	78,7	98,7	96,0
Marras (%)	2,7	36	0	0

Tabla 1: Potencia germinativa y porcentaje de marras.

Gráfico 1: Gráfica acumulativa del número de semillas germinadas

Población	Testigo	Liquenizada	Micorrizada	Liquenizada+ Micorrizada
Altura (mm)	76,3	60,3	103,2	88,6
Longitud de la raíz principal (mm)	206,3	134,5	284,3	232,4
Ø cuello de la raíz (mm)	1,63	1,05	2,30	1,71
Superficie foliar (cm ²)	22,41	12,34	39,62	31,42
Peso de la planta (gr)	0,95	0,44	2,24	1,42
Peso parte aérea seca (gr)	0,33	0,17	0,83	0,39
Peso parte radical seca (gr)	0,25	0,10	0,40	0,36
Robustez	47	57	48	52
Puntos activos (%)	20	20	20	20
Porcentaje de micorrización	--	--	40	30
Fenoles totales en raíz principal (µg/ml)	2,94	3,84	3,32	3,40
Fenoles totales en raíz secundaria (µg/ml)	3,80	6,27	5,30	6,14

Tabla 2: Resultados obtenidos en la cuarta y última extracción

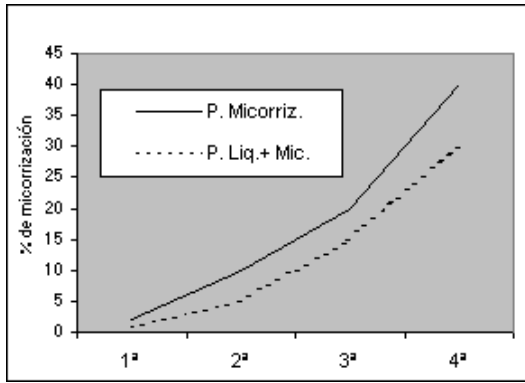


Gráfico 2: Evolución en el tiempo de la tasa de micorrización

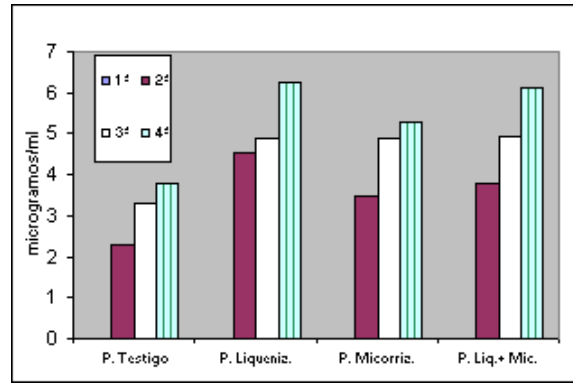


Gráfico 3: Concentración de fenoles totales en raíz secundaria