



5º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-294

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Efecto de la micorrización y la calidad del agua de riego sobre la producción en vivero y el establecimiento en campo de *Pinus pinaster*.

RINCÓN HERRANZ, A.¹, SERRADA HIERRO, R.², ZAMORANO MENESES, A.², CARRILLO PATIÑO, A.³ y OCAÑA BUENO, L.³

¹ Departamento de Sistemas y Recursos Forestales, Centro de Ciencias Forestales (CIFOR), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

² Grupo de Investigación en Ecología y Gestión Forestal Sostenible. EUIT Forestal - UPM (Madrid).

³ Subdirección de I+D+i. Empresa de Transformación Agraria, S.A. (TRAGSA), c/ Maldonado 58, 28006 Madrid. España

Resumen

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto I+D “RODENAL” orientado a estudiar los procesos de regeneración natural post-incendio y el efecto de ciertas prácticas selvícolas en relación con los mismos. Se identificaron inóculos micorrícicos en los suelos de la comarca de El Rodenal (Guadalajara) tras el incendio de 2005, y se testó la eficacia de la inoculación con un hongo ectomicorrícico seleccionado y otras prácticas viverísticas, como la esterilización del sustrato y la calidad del agua de riego, para la producción de planta en envase y su posterior establecimiento en campo.

La aplicación del inóculo micorrícico fue efectiva para la micorrización de las plantas en el vivero, aunque no produjo una mejora significativa de su crecimiento. Por otro lado, el tipo de agua de riego fue un factor clave para el desarrollo de las plantas, observándose además interacciones con la micorrización en cuanto al contenido de nutrientes en las acículas de las mismas.

Al cabo de siete meses del establecimiento de las plantas en campo, se observaron elevadas tasas supervivencia en todos los tratamientos. Al igual que ocurría durante la fase de producción en vivero, la micorrización no afectó significativamente al crecimiento de las plantas, mientras que el tipo de agua de riego y la esterilización del sustrato sí tuvieron un efecto significativo sobre el desarrollo de las mismas.

Palabras clave

Agua de riego, micorrizas, pino rodeno, restauración de zonas incendiadas, vivero.

1. Introducción

La supervivencia y el crecimiento inicial de las plantas una vez trasplantadas a campo, depende en gran medida de su calidad fisiológica. La inoculación con microorganismos beneficiosos, como los hongos ectomicorrícicos, ha demostrado ser una práctica viverística de gran interés para la mejora de la calidad fisiológica de planta forestal (PERA et al. 1998; RINCÓN et al. 2005). La facilidad de producción del inóculo, la compatibilidad con la especie forestal elegida y los efectos de mejora sobre su crecimiento, así como la adaptabilidad ecológica del hongo al lugar de plantación, son importantes criterios de selección de inoculantes fúngicos (BRUNDRET et al. 1996).

Entre los principales mecanismos de acción de las micorrizas, cabe destacar aquellos de tipo nutricional, como el incremento de la superficie de absorción de las raíces y del volumen de suelo explorado, o la movilización de nutrientes limitantes del crecimiento vegetal, como el nitrógeno y el fósforo (SMITH & READ, 1997). Sin embargo, la eficacia de la aplicación

de bioinoculantes depende en gran medida del manejo adecuado de otras prácticas habituales en la producción de planta forestal en vivero, como el régimen de fertilización, el sustrato o la calidad del agua de riego (CORDELL & MARX, 1994). En último término, la supervivencia y el desarrollo de las plantas en condiciones experimentales de campo serán los indicadores determinantes del resultado del manejo integrado de las distintas prácticas viverísticas, incluida la inoculación con hongos seleccionados (BRUNDRET et al. 1996). Generalmente, los efectos de la simbiosis son más evidentes en situaciones de estrés ambiental, por lo que la micorrización inicial de las plantas puede suponer una importante ventaja para su establecimiento en situaciones adversas, como por ejemplo las que tienen lugar tras un incendio forestal.

En julio de 2005, se produjo un importante incendio en la Comarca de El Rodenal (Guadalajara) que afectó a más de 10.000 ha de masas pobladas por pino rodeno. Ese año, la empresa TRAGSA puso en marcha un proyecto denominado “RODENAL”, orientado a estudiar los procesos de regeneración post-incendio. En este contexto, el presente trabajo se ha centrado en la evaluación de distintas prácticas viverísticas para la producción de planta de *Pinus pinaster* Ait., destinada a reforestación en zonas de la Comarca de El Rodenal afectadas por el incendio.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue la valoración de distintas prácticas viverísticas como la inoculación con un hongo ectomicorrícico seleccionado y la calidad del agua de riego para la producción de planta de *Pinus pinaster* en contenedor, y su establecimiento en dos parcelas experimentales afectadas por un incendio en la zona de El Rodenal (Guadalajara).

3. Metodología

Producción de P. pinaster en vivero.

El ensayo para la producción de plantas de *P. pinaster* se llevó a cabo en el vivero forestal de la empresa TRAGSA, en San Fernando de Henares (Madrid).

Diseño experimental. Se planificó un diseño factorial en el que se evaluaron dos factores: a) la inoculación con un hongo ectomicorrícico y b) la calidad del agua de riego. El factor inoculación consistió en dos tratamientos: 1) plantas control no inoculadas y 2) inoculadas con el hongo *Rhizopogon luteolus* Fr. & Nordholm. Por su parte, el factor calidad de agua de riego incluyó dos tratamientos usualmente aplicados en el vivero: 1) agua de grifo (AG) y 2) agua embalsada del río Henares (AR). En total se establecieron 4 tratamientos y 400 plantas por tratamiento, con lo que se produjeron un total de 1.600 plantas. Paralelamente, y sólo para las plantas producidas con agua de río, además de la inoculación, se evaluó el factor esterilización del sustrato. En este caso, 200 plantas control y 200 plantas inoculadas con *R. luteolus* fueron producidas en sustrato no autoclavado (NE) y el mismo número de plantas en sustrato autoclavado (E).

Preparación de inóculos. Los esporocarpos de *R. luteolus* fueron recolectados en pinares de pino rodeno de El Rodenal no afectados por el incendio del 2005. Los esporocarpos fueron deshidratados a 40 °C, durante 5-7 días, en una estufa con circulación forzada de aire. El inóculo de *R. luteolus* se preparó como suspensión acuosa de esporas según la metodología descrita por CASTELLANO et al. (1985). El inóculo, con una

concentración final de 10^5 esporas/ml (determinada por recuento directo al microscopio en un hematocitómetro (Newbauer)), se aplicó a razón de 10 ml por planta, con lo que la concentración final fue de 10^6 esporas/planta. Se llevaron a cabo dos inoculaciones con un intervalo de 3 meses, la primera de las cuales se aplicó un mes después de la germinación de las semillas.

Material vegetal y condiciones de cultivo. Se utilizaron semillas de *P. pinaster* procedentes de ES-Rodenaes de Molina, cosecha 2004/2005. Material Identificado. Las semillas se esterilizaron con H_2O_2 (30 %, v:v), se lavaron en varios cambios de agua y se conservaron a 4 °C hasta su utilización. Las plantas se produjeron en bandejas Fores-pot (Sant Pau, Girona) con 50 alveolos de 300 cc por bandeja. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba rubia (Pindstrup Mosebrug, SAE, Burgos) y vermiculita de grado 3 (Vermiculita y Derivados, SL, Gijón) (3:1, v:v). Para los tratamientos de sustrato estéril, esta mezcla se autoclavó a 120° durante 20 min. Las plantas se regaron con dos tipos de agua de características contrastadas: 1) Agua del grifo del vivero de San Fernando clasificada como bicarbonatada-cálcica y 2) Agua embalsada procedente del río Henares, clasificada como Bicarbonatada-sulfatada-cálcica (Tabla 1). Las bandejas se dispusieron al aire libre y no se aplicó fertilización. El ensayo se inició en junio de 2007 y tuvo una duración total de 9 meses.

Tabla 1. Características de los dos tipos de agua utilizados para el riego durante la producción de plantas de *Pinus pinaster* en vivero. Análisis realizados por el laboratorio CAASA (Murcia).

	Agua de Grifo (AG)	Agua de Río (AR)
pH	7.65	7.31
Conductividad (μ S/cm)	110	873
Nitratos (mg/l)	1.47	8.06
Cloruros (mg/l)	10.97	63.1
Carbonatos (mg/l)	<5	<5
Bicarbonatos (mg/l)	29.74	246
Sulfatos (mg/l)	9.98	142
Sodio (mg/l)	5.20	49
Potasio (mg/l)	0.86	6.65
Calcio (mg/l)	14.4	93.4
Magnesio (mg/l)	<2	26.2
Hierro (mg/l)	<0.05	0
Manganeso (mg/l)	<2	0

Parámetros evaluados y análisis estadístico. Se escogieron un total de 32 plantas al azar por tratamiento, para las que se registraron los siguientes parámetros: diámetro, altura, peso seco aéreo y radical, contenido de nutrientes (N, P, K, Mg, Fe y Mn) en las acículas y porcentaje de ectomicorrizas. El recuento de ectomicorrizas se realizó con ayuda de una lupa binocular según se describe en RINCÓN et al. (2007). Los tallos y las raíces de las plantas se secaron a 65 °C durante 48 h para determinar los pesos secos aéreo (PSA) y radical (PSR). Las acículas desecadas se pulverizaron en un mortero para analizar el contenido en nutrientes. La concentración de N se determinó mediante el método Kjeldahl. El resto del material se digirió con ácido nítrico-perclórico 5:3 (v:v) y se determinaron las concentraciones de P, K, Mg, Fe y Mn mediante espectrometría de emisión por plasma inductivamente acoplado (ICP, Perkin-Elmer).

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, por un lado para inoculación/calidad del agua de riego y por otro para inoculación/sustrato,

con el programa SPSS v 15.0. Previo al ANOVA, cuando fue necesario los datos se transformaron para satisfacer las asunciones de normalidad y homocedasticidad. Los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación $\arcsen(x/100)^2$. Las diferencias entre las medias de los distintos tratamientos se separaron mediante el test de Tukey ($P < 0.05$).

Instalación de P. pinaster en dos parcelas experimentales de campo.

Ubicación y descripción de las parcelas. La parcela 1 se ubicó en un antiguo vivero en desuso, en el término municipal de Ciruelos del Pinar (Guadalajara). Las plantas se distribuyeron en 7 de los bancales del antiguo vivero y el tamaño final de la parcela fue de 104,62 m x 49,82 m. La parcela 2 se ubicó en una zona de pendiente muy acusada conocida como el Barranco de los Infiernos situada en el término municipal de Ablanque (Guadalajara). Las dimensiones de esta parcela fueron de 68 m x 28 m.

Previo a la plantación, en la parcela 1 se realizó un desbroce a hecho con motodesbrozadora y posteriormente, en ambas parcelas se subsoló con un tractor de cadenas (>120 CV) con barra porta-aperos de elevación hidráulica. Se reforzó el cercado existente en la parcela 1 y se procedió al establecimiento de un cerramiento nuevo en la parcela 2. Además, al cabo de 3 meses de la plantación, fue necesario la aplicación manual de herbicida (glifosato: agua, 1:4, v:v) en la parcela 1, debido a la gran proliferación de malas hierbas. Las características de los suelos de ambas parcelas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Características químicas de los suelos de las parcelas experimentales en las que se instalaron plantas de Pinus pinaster producidas con diferentes inoculaciones y riegos durante la fase de vivero. Análisis realizados por el servicio de análisis del CCMA-CSIC (Madrid).

	Parcela 1 (Ciruelos)	Parcela 2 (B. Infiernos)
pH	6.6	5.6
M. Orgánica (%)	2.5	3.4
C total (%)	1.5	2.0
N total (g/kg)	0.70	0.64
P ₂ O ₅ (mg/kg)	31	28.8
K (mg/kg)	117	59
Mg (mg/kg)	142	76
Fe (mg/kg)	54	109
Mn (mg/kg)	84	52

Tratamientos evaluados y diseño experimental. Se evaluaron los mismos factores tenidos en cuenta durante la fase de producción de planta en vivero. Se obtuvieron un total de 8 tratamientos que se utilizaron para el establecimiento de las dos parcelas experimentales de campo anteriormente descritas: 1) Agua del grifo (AG)-Control, 2) AG-R. *luteolus*, 3) Agua del Río (AR)-Control, 4) AR-R. *luteolus*, 5) AR-Control-sustrato autoclavado (E), 6) AR-Control-sustrato no autoclavado (NE), 7) AR-R. *luteolus*-E y 8) AR-R. *luteolus*-NE.

Las dos plantaciones se realizaron en Abril de 2008. En ambas parcelas, se llevó a cabo un diseño de bloques al azar con dos bloques por parcela, y la unidad experimental consistió en una fila de 8 plantas (una por tratamiento). En ambos casos, la plantación se realizó mediante

ahoyado manual con un marco de plantación de 1x1 m. Se plantaron un total de 720 plantas: 360 plantas en cada parcela (180 por bloque y 30 por tratamiento).

Parámetros evaluados y análisis estadístico. Una vez realizada la plantación, se procedió a la toma de datos de altura inicial de las plantas. Al cabo de 7 meses (noviembre de 2008), se tomaron datos de altura y diámetro y se realizó el recuento del número de marras en cada parcela. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa SPSS v. 15.0. Previo al ANOVA y cuando fue necesario, los datos se transformaron para satisfacer las asunciones de normalidad y homocedasticidad. Los factores inoculación y agua de riego, e inoculación y esterilización del sustrato, fueron analizados por separado. Además, en todos los análisis, se tuvo en cuenta el bloque como factor adicional. El análisis de las variables de crecimiento se realizó teniendo en cuenta la altura inicial como covariable. Las diferencias entre las medias de los distintos tratamientos se separaron mediante el test de Tukey ($P < 0.05$).

4. Resultados

Producción de Pinus pinaster en vivero.

Efecto de los factores inoculación y agua de riego.

La inoculación con el hongo no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros de crecimiento evaluados, excepto para la relación aérea/radical (Tabla 3). Sin embargo, la calidad del agua de riego afectó significativamente a la mayoría de los parámetros evaluados (Tabla 3), y no se detectaron interacciones entre los dos factores estudiados (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores inoculación con el hongo ectomicorrícico *R. luteolus* y calidad del agua de riego, e interacción entre ambos, para distintos parámetros de crecimiento y micorrización de plantas de *Pinus pinaster* producidas en contenedor, en vivero. Los valores significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

Parámetros	Inoculación (I)	Calidad del Agua de Riego (A)	Interacción (I x A)
Diámetro	0.931	0.000	0.393
Altura	0.713	0.000	0.358
Peso seco aéreo (PSA)	0.571	0.000	0.710
Peso seco raíz (PSR)	0.418	0.000	0.228
PSA/PSR	0.046	0.828	0.077
Ectomicorrizas	0.000	0.823	0.724

Micorrización y crecimiento. El 55% y el 67% de las plantas control no inoculadas presentaron micorrizas en AG y AR respectivamente, aunque con porcentajes de micorrización no superiores al 25%. Prácticamente todas las plantas (90-100 %) inoculadas con *R. luteolus* resultaron micorrizadas, con porcentajes de ectomicorrizas por planta en torno al 60%, significativamente superiores a los que presentaban las plantas control (Tabla 4). No se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de agua (AG y AR) para los porcentajes de plantas micorrizadas ni para los porcentajes de micorrización de las mismas (Tabla 4).

En cuanto al crecimiento, no se detectaron diferencias significativas debidas a la inoculación con *R. luteolus*, excepto para la relación PSA/PSR que fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con respecto a las control (Tabla 4). Por otro lado, las plantas regadas con agua del río (AR) mostraron un crecimiento significativamente mayor que las regadas con agua del grifo (Tabla 4).

Tabla 4. ANOVA de dos factores: inoculación con el hongo ectomicorrícico *R. luteolus* y calidad del agua de riego para distintos parámetros de crecimiento y micorrización de *Pinus pinaster* producido en vivero. Para cada factor, letras distintas denotan diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey ($P < 0.05$).

	Inoculación		Calidad de Agua de Riego	
	Control	<i>R. luteolus</i>	A. Grifo	A. Río
Diámetro (cm)	0.17 ± 0.04 a	0.17 ± 0.04 a	0.14 ± 0.03 a	0.19 ± 0.03 b
Altura (cm)	7.90 ± 2.60 a	8.00 ± 2.20 a	6.40 ± 1.00 a	9.40 ± 2.40 b
Peso seco aéreo (PSA) (g)	0.41 ± 0.25 a	0.43 ± 0.24 a	0.26 ± 0.10 a	0.58 ± 0.24 b
Peso seco raíz (PSR) (g)	0.39 ± 0.20 a	0.37 ± 0.21 a	0.25 ± 0.12 a	0.50 ± 0.20 b
PSA/PSR	1.11 ± 0.47 a	1.30 ± 0.55 b	1.22 ± 0.62 a	1.19 ± 0.40 a
Ectomicorizas (%)	23.9 ± 20 a	60.2 ± 15 b	42.7 ± 31 a	42.1 ± 29 a

Contenido de nutrientes en las acículas. El factor inoculación sólo tuvo efecto significativo para el contenido de Mg (Tabla 5), mientras que el factor calidad del agua de riego fue significativo para el contenido de todos los nutrientes (Tabla 5). Sin embargo, y excepto para el N, se detectaron interacciones entre los dos factores para el contenido de todos los nutrientes (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores inoculación con el hongo *R. luteolus* y calidad del agua de riego, e interacción entre ambos, para el contenido de nutrientes en las acículas de plantas de *Pinus pinaster* producidas en contenedor, en vivero. Los valores significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

Parámetros	Inoculación (I)	Calidad del Agua de Riego (A)	Interacción (I x A)
Nitrógeno (N)	0.095	0.000	0.721
Fósforo (P)	0.059	0.000	0.005
Potasio (K)	0.184	0.000	0.048
Magnesio (Mg)	0.019	0.000	0.000
Hierro (Fe)	0.740	0.000	0.039
Manganeso (Mn)	0.793	0.000	0.000

Cuando se realizó el ANOVA para cada factor por separado, se corroboró que la inoculación con el hongo no causó diferencias significativas sobre el contenido de nutrientes en las acículas de las plantas (Figura 1), excepto en el caso del Mg en las plantas regadas con AR. Aunque solo fue significativo para el Mg en las plantas AR, en general la inoculación con *R. luteolus* supuso una disminución del contenido de nutrientes en las acículas de las plantas en comparación con el control (Figura 1).

En general, las plantas mostraron un estado nutricional significativamente mejor cuando se regaron con agua del río, excepto en el caso del N, cuyo contenido fue mayor en las plantas regadas con AG (Figura 1).

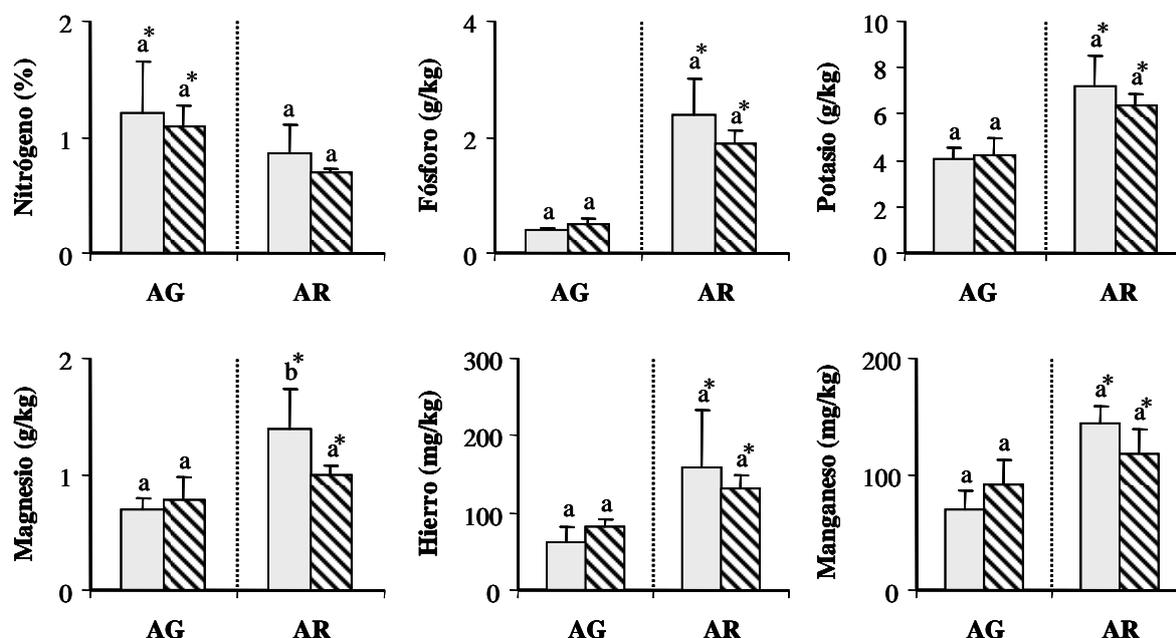


Figura 1. Efecto de los factores Inoculación y Calidad de agua de riego sobre el contenido de nutrientes en las acículas de *Pinus pinaster* producido en contenedor. Para cada tratamiento de Calidad de agua (AG=grifo y AR=río), distintas letras denotan diferencias significativas entre tratamientos de inoculación (test Tukey ($P < 0.05$)). Para cada tratamiento de Inoculación: □=control y ▨=hongo *R. luteolus*, los asteriscos denotan diferencias significativas entre los tratamientos de Calidad de agua (test Tukey ($P < 0.05$)).

Efecto de los factores inoculación y sustrato.

El factor esterilización del sustrato sólo se testó para las plantas regadas con AR. En cuanto a la micorrización, en el sustrato no autoclavado (NE), el 92% de las plantas control y el 100% de las inoculadas con *R. luteolus* resultaron micorrizadas. Sin embargo, en el sustrato autoclavado (A), el 35 % de las plantas control resultaron micorrizadas frente al 100% de las plantas inoculadas con *R. luteolus*. En los dos tipos de sustrato, los porcentajes de micorrizas de las plantas inoculadas con *R. luteolus* (60-65%) fueron significativamente mayores que los que de las plantas control (20-35%).

En cuanto al crecimiento, la inoculación con *R. luteolus* no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros estudiados. Sin embargo, la esterilización del sustrato supuso una reducción significativa del crecimiento de las plantas (datos no mostrados).

Instalación de P. pinaster en dos parcelas experimentales de campo.

Al cabo de 7 meses de su establecimiento en campo, las tasas de supervivencia de las plantas fueron muy elevadas en las dos plantaciones. Se observó un 18 % de marras en la parcela 1 del vivero de Ciruelos, mientras que en la parcela 2 del Barranco de los Infiernos la supervivencia de las plantas fue del 100%.

Efecto de los factores inoculación y agua de riego.

En las dos parcelas, el análisis de varianza mostró un efecto significativo de ambos factores sobre las variables de crecimiento evaluadas, excepto para la altura y el incremento en altura en la parcela 2 (Tabla 6). Por otro lado, se observaron interacciones entre la inoculación y el agua de riego para la altura y el diámetro en la parcela 2 (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores inoculación con R. luteolus y calidad del agua de riego, e interacción entre ambos, para la altura, el diámetro y el incremento en altura de plantas de Pinus pinaster establecidas en dos parcelas experimentales en la Comarca de El Rodenal. En todos los casos se tuvo en cuenta como co-variable la altura inicial de las plantas. Los valores significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

	Parcela 1 (Ciruelos)			Parcela 2 (B. Infiernos)		
	Altura	Incremento	Diámetro	Altura	Incremento	Diámetro
Inoculación (I)	0.000	0.000	0.019	0.242	0.405	0.011
Agua (A)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Bloque (B)	0.516	0.601	0.899	0.129	0.117	0.000
IxA	0.133	0.078	0.104	0.001	0.114	0.027

Los resultados del análisis de los factores inoculación y calidad de agua por separado se muestran en la Figura 2. Para las plantas regadas con agua de grifo (AG), la inoculación con el hongo supuso un descenso significativo del crecimiento de las plantas con respecto al control, tanto en la parcela del Vivero de Ciruelos (Figura 2 A-C) como en la del Barranco de los Infiernos (Figura 2 D-F). Sin embargo, para las plantas regadas con agua de río (AR), no se detectaron diferencias de crecimiento debidas a la inoculación con *R. luteolus* en ninguna de las parcelas (Figura 2).

En cuanto al efecto de la calidad del agua, en general se registró un crecimiento significativamente mayor de las plantas regadas con AR en comparación con AG en ambas parcelas, efecto que resultó más evidente para las plantas inoculadas con el hongo (Figura 2).

En general, e independientemente de los factores evaluados, las plantas mostraron un mejor desarrollo en la parcela del Barranco de los Infiernos (Figura 2).

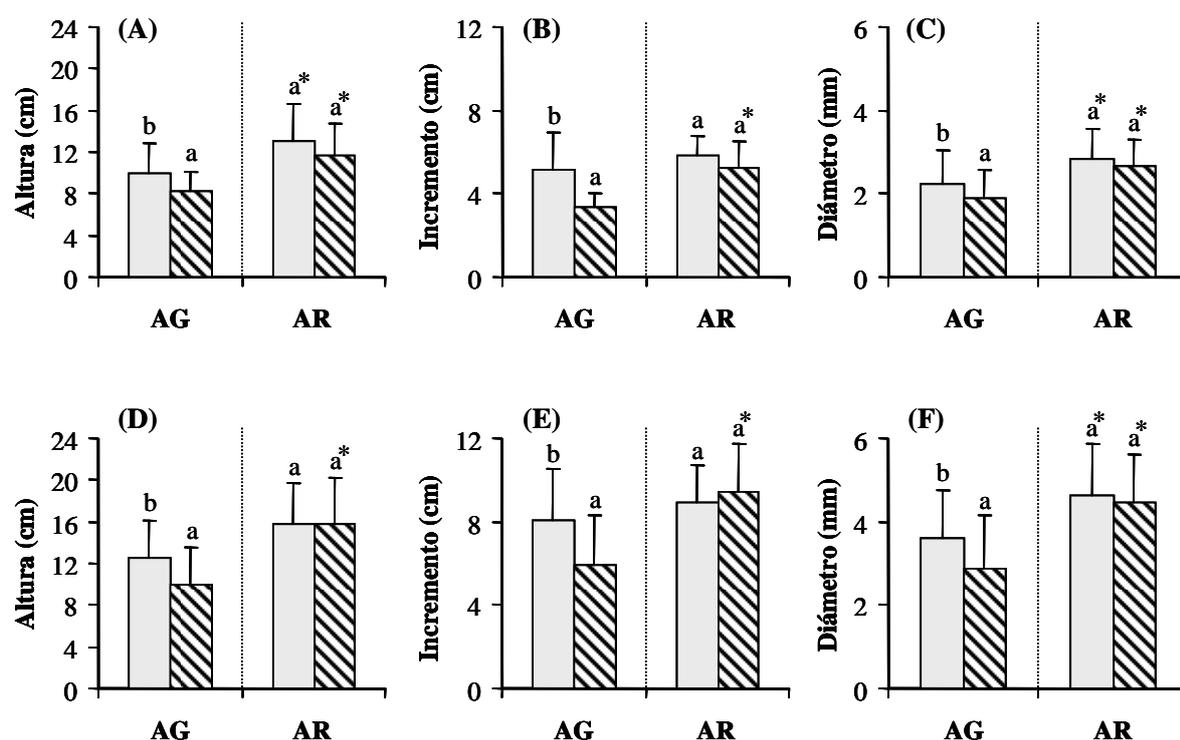


Figura 2. Efecto de los factores Inoculación y Calidad de agua de riego sobre crecimiento de plantas de *Pinus pinaster* en dos parcelas experimentales establecidas en zonas afectadas por el incendio de El Rodenal: (A-C) Parcela 1 Vivero de Ciruelos; (D-F) Parcela 2 Barranco de los Infiernos. En todos los casos, para el ANOVA se tuvo en cuenta la altura inicial de las plantas como covariable, y los valores de las figuras corresponden a las medias reales de crecimiento de las plantas. Dentro de cada tratamiento de Calidad de agua (AG=grifo y AR=río), distintas letras denotan diferencias significativas entre tratamientos de inoculación (test Tukey ($P < 0.05$)). Para cada tratamiento de Inoculación: □=control y ▨=hongo *R. luteolus*, los asteriscos denotan diferencias significativas entre los tratamientos de Calidad de agua (test Tukey ($P < 0.05$)).

Efecto de los factores inoculación y sustrato. La inoculación con el hongo no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas en comparación con el tratamiento control, en ninguna de las dos parcelas (Tabla 7). Sin embargo, la esterilización del sustrato sí tuvo un efecto significativo sobre el diámetro de las plantas en ambas parcelas y además sobre la altura en la parcela 2 (Tabla 7). No se detectó interacción entre los dos factores evaluados.

Tabla 7. Análisis de la varianza (ANOVA) de los factores inoculación y esterilización del sustrato, e interacción entre ambos, para la altura, el incremento en altura y el diámetro de plantas de *Pinus pinaster* establecidas en dos parcelas experimentales en la Comarca de El Rodenal. Los valores significativos ($P < 0.05$) se resaltan en negrita.

	Parcela 1 (Ciruelos)			Parcela 2 (B. Infiernos)		
	Altura	Incremento	Diámetro	Altura	Incremento	Diámetro
Inoculación (I)	0.051	0.133	0.154	0.609	0.329	0.278
Sustrato (S)	0.372	0.428	0.000	0.006	0.583	0.000
Bloque (B)	0.480	0.397	0.152	0.275	0.066	0.000
IxS	0.690	0.390	0.312	0.593	0.460	0.933

En general, las plantas crecidas en sustrato autoclavado presentaron los menores valores de crecimiento en comparación con el tratamiento de sustrato no autoclavado (datos no mostrados).

5. Discusión

Producción de Pinus pinaster en vivero.

El inóculo de esporas del hongo *R. luteolus* fue efectivo para la obtención de planta micorrizada de *P. pinaster* en contenedor. La gran cantidad de esporas que se puede obtener de un sólo esporocarpio, junto con la facilidad de aplicación de este tipo de inóculo, hacen que esta sea una metodología de inoculación eficaz para su empleo a gran escala en vivero. La aplicación de suspensiones acuosas de esporas de distintas especies del género *Rhizopogon* ha resultado efectiva en ensayos similares para la producción de planta de *P. pinaster* micorrizada en contenedor (PARLADÉ y col. 1996) y de otras coníferas como *Pseudotsuga menziesii* (PARLADÉ y col. 1996), *P. halepensis* y *Pinus pinea* (RINCÓN y col 2005).

A pesar del buen nivel de micorrización de las plantas, la asociación con *R. luteolus* no produjo una mejora significativa del crecimiento ni de la concentración de nutrientes en las acículas, en comparación con las plantas no inoculadas. Por otro lado, las plantas control también resultaron micorrizadas con hongos del vivero (tipo *Thelephora*), aunque con tasas de micorrización no superiores al 25%. Distintos autores han apuntado un efecto variable de la micorrización controlada sobre el crecimiento de las plantas durante la fase de producción en vivero, que depende tanto del hongo y de la planta implicados, como de las condiciones de cultivo que se apliquen en el vivero (LE TACON y col 1992, PERA y col 1998). Es frecuente que los hongos micorrícicos inoculados no estimulen el crecimiento de las plantas durante la fase de producción en vivero, y que incluso en algunos casos, produzcan una disminución significativa del mismo (LE TACON y col. 1992; PERA y col. 1998; RINCÓN y col. 2005). Este efecto podría ser debido, en parte, a una elevada demanda de hidratos de carbono para el mantenimiento de las estructuras fúngicas, más acusada en el caso de especies de hongos que producen abundante micelio externo, como *R. luteolus*. Por otro lado, las condiciones de confinamiento del contenedor, suelen impedir el desarrollo funcional del micelio externo que está directamente implicado en el aumento del volumen de suelo explorado por la raíz y en la captación de nutrientes a larga distancia.

El agua de riego que se aplicó durante la fase de producción de *P. pinaster* en vivero, ha demostrado ser un factor clave para el desarrollo de las plantas. En general la aplicación del agua depurada de las instalaciones del vivero (agua de grifo-AG) dio lugar a un peor desarrollo de las plantas en comparación con el agua del río (AR). Como era de esperar, el análisis de los dos tipos de agua reveló una conductividad del AR casi 8 veces superior a la del AG y un contenido en nutrientes muy superior. Esto, a su vez se tradujo en niveles de nutrientes significativamente mayores en las acículas de las plantas regadas con AR, excepto en el caso del N. Curiosamente, no se observaron interacciones entre la inoculación y el agua de riego para los parámetros de crecimiento medidos en las plantas y sin embargo, excepto para el N, ambos factores interactuaron en cuanto al contenido de todos los nutrientes evaluados en las acículas. Por su parte, la esterilización del sustrato supuso una disminución del crecimiento de las plantas, en gran parte debido a la eliminación de la microflora asociada al sustrato (bacterias y hongos). Todos estos resultados no sólo ponen de manifiesto la estrecha relación nutricional entre el hongo y la planta en la simbiosis ectomicorrícica, si no también la importancia del ajuste adecuado de otras prácticas habituales en la producción de planta forestal en vivero, como el régimen de fertilización, el sustrato y la calidad del agua de riego para la producción de planta micorrizada con hongos seleccionados (CORDELL & MARX, 1994).

Desarrollo de Pinus pinaster en parcelas experimentales de campo

Al cabo de 7 meses de su establecimiento en campo, las tasas de supervivencia de las plantas fueron muy elevadas en ambas parcelas, independientemente de los tratamientos aplicados durante la fase de producción en vivero, lo que indicaba que todo el stock de planta utilizado tenía buena calidad fisiológica a pesar de que, en algunos casos, no alcanzaba, posiblemente por el retraso de la siembra en vivero, los valores morfológicos recomendados para *P. pinaster* de 1 savia (h de 7 a 30 cm; d mayor de 2 mm) por el RD 289/2003.

Por otro lado, la elevada supervivencia de las plantas reflejaba la gran adaptación de *P. pinaster* a las condiciones edafoclimáticas de la zona. Hay que considerar que el verano de 2008 fue lluvioso y la disponibilidad de agua durante el periodo estival no fue limitante para el establecimiento de las plantas, y por otro, las características del suelo de las dos parcelas se adecuaban a los requerimientos de esta especie forestal. La supervivencia fue mayor en la parcela del Barranco de los Infiernos, donde además, las plantas presentaron tasas de crecimiento mayores que las del vivero de Ciruelos. Estos resultados pueden deberse en parte a la mayor pedregosidad y aireación del terreno en la parcela del Barranco en comparación con el suelo del Vivero de Ciruelos, ya que *P. pinaster* es una especie que no sólo soporta mal la inundación del terreno si no también su compactación (PEÑUELAS y OCAÑA, 1996; SERRADA, 2000). Por otro lado, aunque el suelo de la parcela del Barranco presentaba valores mas bajos de nutrientes, el pH era más adecuado para el desarrollo de *P. pinaster* (PEÑUELAS y OCAÑA, 1996).

Con respecto a la inoculación, y al igual que sucedía durante la fase de producción de planta en vivero, no se observó una estimulación del crecimiento de las plantas en ninguna de las dos parcelas, e incluso en algunos casos, como el de las plantas regadas con agua del grifo, la inoculación con el hongo supuso una disminución del mismo. Como se ha comentado con anterioridad, esto pudo ser debido a la elevada demanda de hidratos de carbono por parte del hongo y a las condiciones de menor disponibilidad de nutrientes cuando se regó con agua del grifo durante la fase de producción en vivero (SMITH & READ, 1997).

Sin embargo, es necesario un seguimiento a más largo plazo del crecimiento de las plantas en campo para verificar estos resultados que sólo hacen referencia a siete meses desde la plantación. El efecto del hongo a largo plazo, dependerá en gran medida de su persistencia en las raíces y de si resulta suficientemente competitivo frente a otros hongos micorrícicos presentes en la zona. En este sentido, una de las ventajas es que el material fúngico utilizado en este ensayo se obtuvo en asociación con *P. pinaster* de la misma zona donde posteriormente se instalaron las parcelas, lo que garantiza la adaptabilidad ecológica del hongo al lugar de transplante.

En general, en ambas parcelas, las plantas regadas con agua del río presentaron un crecimiento mayor y más homogéneo que las regadas con agua del grifo, con independencia de la inoculación. Lo mismo sucedió con las plantas producidas en sustrato no autoclavado en comparación con el sustrato estéril. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de adecuar las prácticas rutinarias del vivero a los requerimientos de una especie forestal determinada, en este caso *P. pinaster*, para la optimización de su producción (CORDELL & MARX, 1994).



Finalmente, cabe señalar que los resultados obtenidos en las dos parcelas experimentales deben considerarse como preliminares debido al escaso periodo de tiempo de establecimiento de las plantas en campo, por lo que es necesario un seguimiento continuado de las plantaciones a más largo plazo para poder extraer conclusiones definitivas.

6. Conclusiones

El inóculo de esporas de *R. luteolus* resultó eficaz para la obtención de planta micorrizada de *P. pinaster* en contenedor, en vivero. Sin embargo, a pesar del buen nivel de micorrización de las plantas, la inoculación con el hongo no supuso una mejora significativa de su crecimiento, ni de la concentración de nutrientes acumulados en las acículas. Esta falta de efecto del hongo puede ser debida por un lado, a un alto coste del mantenimiento de la simbiosis para la planta (alta demanda de hidratos de carbono por parte del hongo), y por otro lado puede estar también relacionada con un escaso desarrollo funcional del micelio externo (responsable de la captación de nutrientes a larga distancia), debido al confinamiento de las raíces en el contenedor.

El agua del riego aplicado para la producción de las plantas resultó ser un factor clave para su desarrollo. La aplicación de agua embalsada de río (con mayor contenido en nutrientes) mejoró muy significativamente el desarrollo de las plantas en comparación con el agua depurada del grifo.

Aunque no se observaron interacciones entre inoculación y calidad del agua de riego para el crecimiento de las plantas, éstas fueron evidentes para el contenido de nutrientes en las acículas. Estos resultados ponen de manifiesto la estrecha relación nutricional entre el hongo y la planta en la simbiosis ectomicorrícica, y también la importancia del ajuste adecuado de otras prácticas habituales en la producción de planta forestal en vivero, para la producción de planta micorrizada con hongos seleccionados.

En cuanto a las parcelas experimentales de El Rodenal, se obtuvieron tasas muy elevadas de supervivencia de las plantas siete meses después de su establecimiento en campo, independientemente de los tratamientos aplicados durante la fase de producción en vivero.

Los mejores resultados, tanto de supervivencia como de crecimiento de las plantas, se obtuvieron en la parcela del Barranco de los Infiernos, que presentaba un suelo más aireado y de menor pH que el de la parcela instalada en el antiguo vivero de Ciruelos. Al igual que sucedía durante la fase de producción de planta en vivero, no se observó un efecto significativo de mejora del crecimiento debido a la inoculación con el hongo, pero si se mantuvo el efecto positivo del agua de riego. No obstante, los resultados obtenidos en las dos parcelas experimentales son muy preliminares y es necesario un seguimiento continuado a más largo plazo de las plantaciones para poder extraer conclusiones definitivas.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de I+D “RODENAL” desarrollado por TRAGSA en colaboración con el INIA, el IRN/CSIC, el CINAM y la UPM, y con el apoyo de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

8. Bibliografía

- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N.; 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Monograph 32. ACIAR, Canberra
- CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M.; MOLINA, R.; 1985. Inoculation of container-grown Douglas-fir seedlings with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. *Can. J. For. Res.* 15:10–13.
- CORDELL, C.E.; MARX D.H.; 1994. Effects of nursery cultural practices on management of specific ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. En: PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G.; (eds.): *Mycorrhizae and Plant Health*, 133–151. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- LE TACON, F.; ÁLVAREZ, I.F.; BOUCHARD, D.; HENRION, B.; JACKSON, R.M.; LUFF, S.; PARLADÉ, J.; PERA, J.; STENSTROM, E.; VILLENEUVE, N.; WALKER, C.; 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In: READ, D.J., LEWIS, D.H., FITTER, A.H., ALEXANDER, I.J.; (eds.) *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB, Oxford, pp 119–134
- PARLADÉ, J.; PERA, J.; ÁLVAREZ, I.; 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 237-245.
- PEÑUELAS, J.L.; OCAÑA, L.; 1996. *Cultivo de plantas forestales en contenedor*. MAPA. Ed. Mundiprensa, Madrid. 190 pp.
- PERA, J.; ÁLVAREZ, I.; PARLADÉ, J.; 1998. Eficacia del inóculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrizicos para la micorrización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*, en contenedor. *Sistemas y Recursos Forestales* 7:139-154.
- RINCÓN, A.; PARLADÉ, J.; PERA, J.; 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. *Ann. For. Sci.* 62: 1-6.
- RINCÓN, A.; DE FELIPE, M.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. 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.
- SERRADA, R.; 2000. *Apuntes de Repoblaciones Forestales*. Ed. Fundación Conde del Valle de Salazar. Madrid.
- SMITH, S. E.; READ, D. J.; 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Cambridge, U.K. 605 pp.

