

MICORRIZACIÓN DE PLANTA DE *POPULUS TREMULA* L.

G. Navas Gil; P. Martínez Zurimendi; R. Sierra de Grado; O. Carrillo Bobillo; V. Pando Fernández*.
Dpto. de Producción Vegetal y Silvopascicultura
*Dpto. de Estadística e Investigación Operativa
E.T.S. de Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid.
Avda. de Madrid, nº 57, 34.004 PALENCIA
Telf. 979 729048 Fax: 979 712099
e-mail: mzurimen@pvs.uva.es

RESUMEN

La inoculación de álamo temblón con hongos micorrícicos, es interesante para incrementar la supervivencia y crecimiento de las plantas, así como para la producción de carpóforos de especies comestibles.

Se han inoculado en vivero plantas de *Populus tremula*, obtenidas mediante estaquilla de raíz, semilla y cultivo *in vitro*. La inoculación se ha realizado con las siguientes especies: *Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum*, *Paxillus involutus* y *Lactarius controversus*.

La técnica utilizada ha sido siempre el riego esporal, combinando diferentes especies de hongos: aisladas, comestibles, no comestibles, combinación de tres de ellas y testigo (sin hongos). Se realizaron tres aplicaciones, con una dosis de aplicación de 3 a 7×10^5 esporas/ml.

Para la planta de estaquilla de raíz, el mejor crecimiento en altura se da en el tratamiento 2 (*Paxillus involutus*). En planta de semilla, en el tratamiento 3 (*Leccinum aurantiacum*, *Leccinum duriusculum* y *Paxillus involutus*). En planta obtenida de cultivo *in vitro*, en el tratamiento 6 (*Leccinum aurantiacum*).

PALABRAS CLAVE: *Populus tremula*, micorrizas, *Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum*, *Paxillus involutus*, *Lactarius controversus*.

SUMMARY

Artificial mycorrhization in *Populus tremula* L. is interesting in order to increase plants survival and growth as well as mushroom yield of edible species.

Populus tremula L. plants have been inoculated in nursery. These plants have been obtained from root cutting, seed and *in vitro* culture. Following fungi species were used in the inoculation process: *Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum*, *Paxillus involutus* and *Lactarius controversus*.

Spore watering has been always used by combining different fungi species: isolated, edible, non-edible, combination of three of them and witness (without mushrooms). Three applications were carried out with an application dose was between 3 and 7×10^5 spores/ml.

For the root cutting plant, the best growth height is for handling 2 (*Paxillus involutus*). In seed plants, in handling 3 (*Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum* y *Paxillus involutus*). For plants have been obtained from culture *in vitro* plant, in handling 6 (*Leccinum aurantiacum*).

KEY WORDS: *Populus tremula*, mycorrhizas, *Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum*, *Paxillus involutus*, *Lactarius controversus*.

INTRODUCCIÓN

Las plantaciones de chopo cuyo fin es la obtención de madera para distintos usos, principalmente el desarrollo (Baeyens, 1991), son muy comunes en las riberas del río Duero y Ebro (Padró, 1992; Fernández, 1997). Se puede decir que dos son las características comunes en este tipo de explotaciones: el uso generalizado de la misma especie y frecuentemente del mismo clon en grandes extensiones, y la ubicación únicamente en riberas con poca altitud.

El *Populus tremula* L. en España es una especie nativa de media–alta montaña, con frecuencia asociada a riberas o cursos de agua. Cuenta por tanto con dos características interesantes para su posible explotación comercial: es una especie susceptible de ser usada en plantaciones en nuestro país, y además, alcanza mayor altitud que otras especies y clones de chopo comerciales. Supone además, una novedad en lo referente al uso de la especie junto con hongos micorrizógenos (Cripps & Orson, 1994).

Las ventajas de la micorrización son varias: suponen un mayor desarrollo de las plantas micorrizadas con una mayor absorción de nitrógeno y fósforo por parte de las raíces (Duñabeitia, Hormilla *et al.*, 1991), mejoran la supervivencia de la planta en plantaciones (Foucard, 1997) y contribuyen a la buena adaptación de la planta a su estación. Aportan un futuro aprovechamiento micológico con su correspondiente beneficio económico (Oliver, Guinberteau *et al.*, 1997).

Los objetivos son comparar el efecto sobre el crecimiento en vivero de la inoculación de diversas especies micorrícicas en plantas de álamo temblón obtenidas por tres formas distintas de propagación (semilla, estaquilla de raíz y cultivo *in vitro*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Existen diversos métodos de obtención de planta de álamo temblón (Pierik, 1990), utilizándose en el presente estudio planta obtenida con tres de los métodos: estaquilla de raíz, semilla y cultivo *in vitro*.

Varios son los hongos asociados a *Populus tremula* L en la provincia de Palencia: *Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum*, *Paxillus involutus*, *Xerocomus chrysenteron*, *Lactarius controversus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Tricholoma populinum*, *Hebeloma faurei*, *Tuber rufum*, *Hymenogaster populetorum*, *Hymenogaster luteus* e *Hymenogaster olivaceus* (García Blanco, A., com. pers.).

Los hongos ectomicorrícicos utilizados han sido: dos comestibles (*Leccinum duriusculum*, *Leccinum aurantiacum*) y dos no comestibles (*Paxillus involutus*, *Lactarius controversus*). De los distintos tipos de inóculo posibles se ha utilizado inóculo esporal (Honrubia *et al.*, 1995; Pera *et al.*, 1994).

Las plántulas obtenidas por estaquilla de raíz y semilla fueron llevadas a vivero (Calabazanos, Palencia) en la primavera-verano de 1999, y las procedentes de cultivo *in vitro*, en primavera de 2000. Estas plantas se infectaron con los hongos

mediante riego esporal, con concentración de 3 a 7×10^5 esporas/ml. Desde entonces y hasta febrero de 2001 se han medido alturas y diámetros, en 11 ocasiones en planta de raíz y semilla, y en 8 en planta obtenida *in vitro*.

Preparación de la plántula

Se contaba con planta obtenida a partir de estaquilla de raíz y de semilla, la cual se encontraba ya en el vivero de Calabazanos, creciendo bajo umbráculo. Se plantaron en distinta fecha, primavera y verano de 1.999 respectivamente, presentando tamaños diferentes.

La planta procedente de cultivo *in vitro* se obtuvo a partir de la colección clonal existente en la E.T.S.I.I.A.A. de Palencia, según las etapas típicas de micropropagación: preparación de planta madre y cultivo, proliferación, enraizamiento y aclimatación al ambiente natural. Fue sacada a aclimatación en marzo de 2000, pasando en mayo a umbráculo (instalaciones de la E.T.S.I.I.A.A.), para finalmente ser llevada junto con las de estaquilla de raíz y de semilla al umbráculo de Calabazanos a principios de junio.

Preparación de inóculo esporal

Los carpóforos de las 4 especies utilizadas se recolectaron en Castilla y León en otoño de 1999. Se extrajeron sus esporas para preparar cuatro caldos esporales, uno por especie, hallándose sus concentraciones por recuento directo al microscopio. Con los caldos esporales, se realizaron tres riegos en vivero en las plantas de estaquilla de raíz y de semilla en noviembre de 1999, aplicando a cada planta aproximadamente 100 ml con las dosis siguientes: primer riego 1×10^5 esporas/ml, segundo riego 5×10^5 esporas/ml, tercer riego 1×10^5 esporas/ml.

En la planta procedente de cultivo *in vitro* se emplearon en primavera de 2000 hongos congelados para la preparación de los caldos esporales, aplicando también 100 ml por planta en los riegos esporales, siendo la dosis de aplicación en los tres riegos de 1×10^5 esporas/ml.

Diseño experimental

Se contaba en vivero con 3 filas de plantas de estaquilla de raíz, 4 de semilla y 2 de cultivo *in vitro*. En dichas filas, se distribuyeron al azar los tratamientos para los que se disponía de inóculo esporal que se reflejan en la tabla 1. La primera medición de alturas en plantas procedentes de estaquilla de raíz y de semilla se realizó el 29/11/99, un mes después de los riegos esporales. Posteriormente, se realizaron otras diez mediciones con una periodicidad de aproximadamente dos semanas y media. En plantas procedentes de cultivo *in vitro* la primera medición se realizó el 25/5/00, una semana después de los riegos esporales. Se realizaron siete mediciones más con un intervalo de dos semanas y media.

El análisis de la variable altura se ha realizado a través de un análisis de varianza de medidas repetidas con los factores: sistema de obtención de planta, tratamiento e interacciones.

Tratamientos	Est. RAÍZ	SEMILLA	Cultivo <i>in vitro</i>
1: LA + LD	36	30	-
2: PI	36	30	26
3: LA+LD+PI	36	30	28
4: TESTIGO (no tratado)	36	30	32
5: LD	36	30	21
6: LA	36	30	22
7: LC	-	30	-
8: LC + PI	-	30	-
TOTAL PLANTAS	216	240	129

Tabla 1: Número de plantas por tratamiento. LA: *Leccinum aurantiacum*, LD: *Leccinum duriusculum*, PI: *Paxillus involutus*, LC: *Lactarius controversus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis de varianza de medidas repetidas se observa que es significativo tanto el factor sistema de obtención como el tratamiento, siendo también diferente la evolución de cada grupo de plantas en el tiempo. Los resultados de lamicorrización pueden ser diferentes en los tres tipos de planta debido a las diferencias en sus sistemas radicales, en cuanto a cantidad y tipo de raíces.

En la tabla 2 se han reflejado las alturas medias (cm) en la primera y la última medición, indicándose las diferencias existentes entre tratamientos al 95% de confianza basándose en contrastes individuales para cada fecha.

Fecha Tratamiento	Est. Raíz inicial	Est. Raíz final	Semilla inicial	Semilla Final	<i>In vitro</i> inicial	<i>In vitro</i> Final
1: LA + LD	53.48 c	252.77 c	15.72 c	247.65 abc		
2: PI	62.41 bc	286.71 b	32.55 b	230.34 bcd	12.17 a	73.47 ac
3: LA+LD+PI	76.48 a	320.00 a	26.60 b	253.80 ab	12.62 a	58.25 d
4: TESTIGO (no tratado)	63.66 b	283.18 bc	33.03 b	199.68 e	12.56 a	71.16 bc
5: LD	63.53 b	273.81 bc	28.81 b	201.95 de	11.20 a	81.80 ab
6: LA	45.62 c	214.93 d	31.96 b	242.86 bc	12.45 a	85.80 a
7: LC			31.33 b	236.03 bc		
8: LC + PI			51.67 a	275.53 a		

Tabla 2: Alturas medias de los distintos tipos de planta para los diferentes tratamientos, en la medición inicial y en la medición final. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes al 95% de confianza. LA: *Leccinum aurantiacum*, LD: *Leccinum duriusculum*, PI: *Paxillus involutus*, LC: *Lactarius controversus*.

Plantas procedentes de estaquilla de raíz

Situación inicial: las plantas de los tratamientos 1 (LA+LD), 3 (LA+LD+PI) y 6 (LA), no tienen la misma altura que el resto de las plantas de los otros tratamientos, siendo las más altas las del tratamiento 3, y las más pequeñas las de los

tratamientos 6 y 1, tal y como se observa en el gráfico 1. Los tratamientos 2 (PI), 4 (testigo) y 5 (LD), no tienen alturas significativamente diferentes, con lo que se puede afirmar que tienen las mismas condiciones de partida.

Situación final: el T6 (LA) continúa siendo el de menor altura seguido del T1 (LA+LD), y el T3 (LA+LD+PI) sigue siendo el de mayor altura. Estos tres tratamientos no son comparables con los demás debido a que no tuvieron las mismas alturas de partida y esas diferencias se han seguido manteniendo con el paso del tiempo.

De los tratamientos que sí son comparables, el T2 (PI) no es significativamente distinto de los tratamientos 4 (testigo) y 5 (LD), si bien es el que mayor altura de estos tres tratamientos ha presentado. Por tanto los tratamientos comparables no han reflejado diferencia significativa con respecto al testigo (sin riegosporal). El tratamiento 5 puede ser interesante para lograr un posterior aprovechamiento micológico.

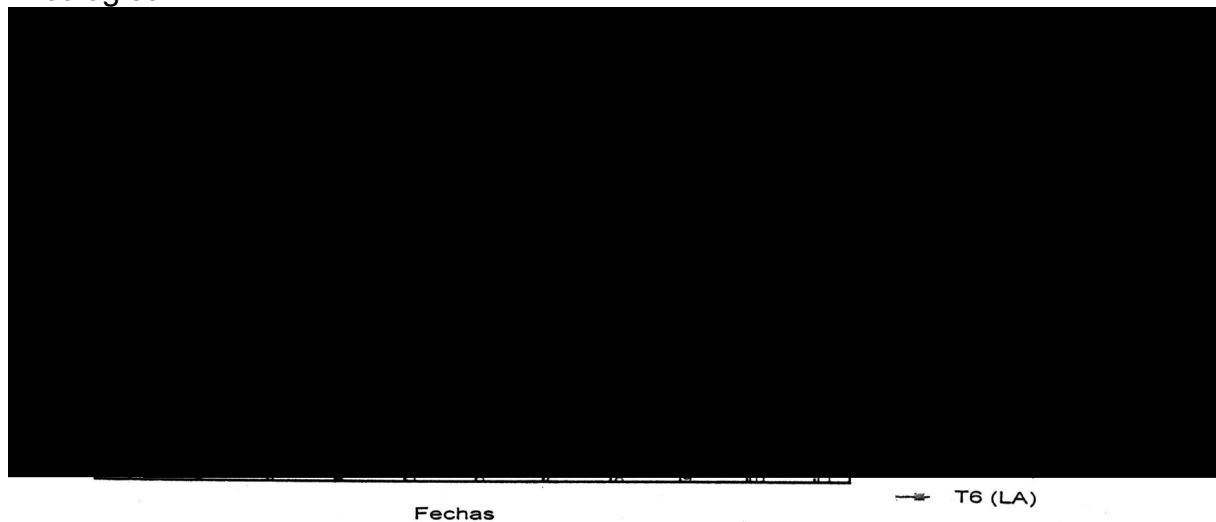


Gráfico 1: Media de las alturas por fechas en plantas de estaquilla de raíz. (LA: *Leccinum aurantiacum*, LD: *Leccinum duriusculum*, PI: *Paxillus involutus*, LC: *Lactarius controversus*).

Plantas procedentes de semilla

Situación inicial: las plantas del tratamiento 8 (LC+PI) son significativamente más altas que el resto de las plantas. Los T2 (PI), T3 (LA+LD+PI), T4 (testigo), T5 (LD), T6 (LA) y T7 (LC), no son significativamente distintos entre sí, pero sí del T1 (LA+LD). Las plantas del T1 (LA+LD) son significativamente menores que las de los demás tratamientos.

Situación final: el tratamiento 8 (LC+PI) sigue siendo el de mayor altura, no siendo comparable con los demás. Los T1 (LA+LD), T2 (PI), T3 (LA+LD+PI), T6 (LA) y T7 (LC) no son significativamente diferentes. El T5 (LD) es de menor altura que los anteriores no siendo significativamente distinto del T2 (PI). El T4 (testigo) es el menor de todos y no es significativamente diferente del T5 (LD).

El tratamiento 3 (LA+LD+PI) es el que mayor crecimiento ha tenido dentro de los tratamientos comparables, lo que parece indicar que esta combinación de tres especies micorrícicas favorece el crecimiento en altura de la planta. En el otro extremo está el T4 (testigo), que al no tener ningún tipo de hongo es el que menos ha crecido. En cuanto al resto de los tratamientos, no existen diferencias significativas entre ellos siendo bastante homogéneos.

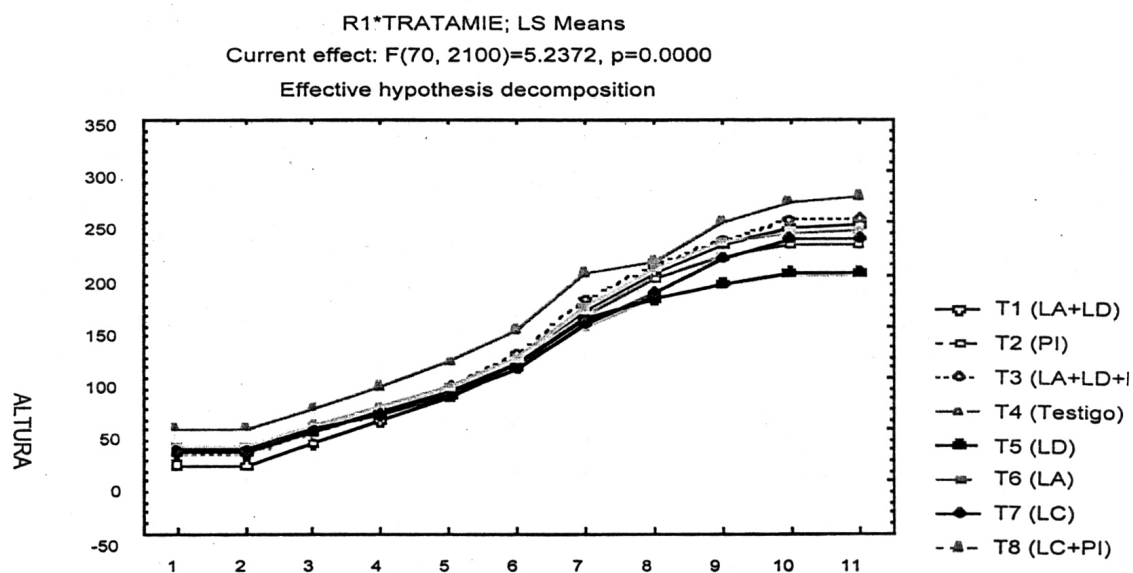


Gráfico 2: Media de las alturas por fechas en plantas procedentes de semilla. (LA: *Leccinum aurantiacum*, LD: *Leccinum duriusculum*, PI: *Paxillus involutus*, LC: *Lactarius controversus*).

Plantas procedentes de cultivo *in vitro*

Situación inicial: los T2 (PI), T3 (LA+LD+PI), T4 (testigo), T5 (LD) y T6 (LA), no son significativamente distintos, o lo que es lo mismo, todas las plantas parten de la misma situación inicial.

Situación final: El T6 (LA) es el tratamiento en el que las plantas alcanzan mayor altura, no guardando diferencias significativas con los T5 (LD) y T2 (PI), pero sí con el resto. Los T2 (PI), T4 (testigo) y T5 (LD), no son significativamente diferentes entre sí. El T3 (LA+LD+PI) es significativamente distinto de los demás, siendo el de menor altura.

Conviene señalar que la planta procedente de cultivo *in vitro* tiene una edad menor a la de semilla y estacilla de raíz. Los T6 (LA) y T5 (LD) son los que mayores alturas tienen, al contrario de lo que ocurría en semilla y raíz que eran de los que menos. El T3 (LA+LD+PI) aquí es el menor, mientras que antes era de los de mayor altura. En cuanto al T4 (testigo) ocupa una posición intermedia-baja como en semilla y raíz.

El tratamiento 1 (*Leccinum aurantiacum* + *Leccinum duriusculum*) no es comparable en planta procedente de estacilla de raíz. En planta procedente de semilla tiene

una altura media comparada con los demás tratamientos. No mejora el crecimiento en altura, pero lo importante es que proporcionará un aprovechamiento micológico posterior. Contemplando ambos hongos comestibles por separado, se observa que el tratamiento 5 (*Leccinum duriusculum*) al igual que el tratamiento 1 no produce incrementos en altura significativos, ocupando posiciones intermedias, y que el tratamiento 6 (*Leccinum aurantiacum*) en planta procedente de semilla ocupa posiciones medias, mientras en planta procedente de cultivo *in vitro* es el mejor.

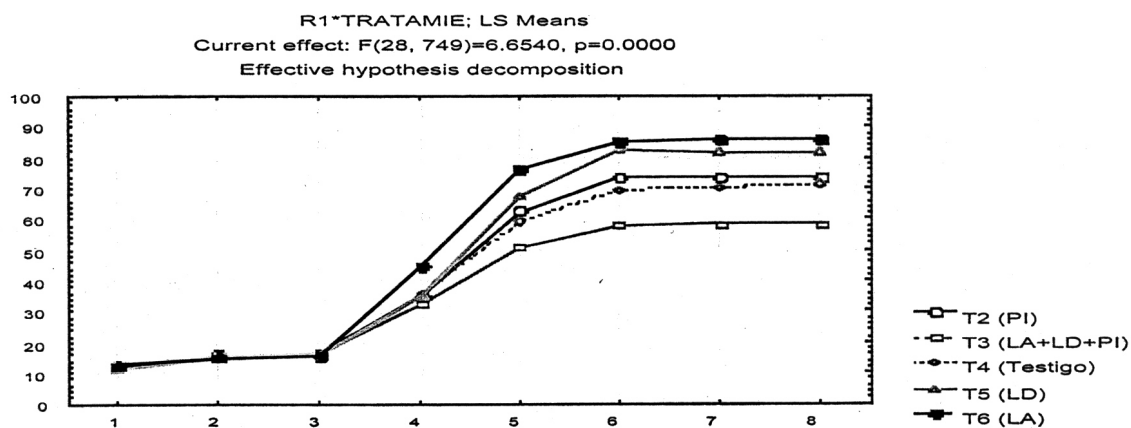


Gráfico 3: Media de las alturas por fechas en plantas de cultivo *in vitro*. (LA: *Leccinum aurantiacum*, LD: *Leccinum duriusculum*, PI: *Paxillus involutus*, LC: *Lactarius controversus*).

El tratamiento 8 (*Lactarius controversus* + *Paxillus involutus*) sólo se ha ensayado en plantas de semilla y no es comparable con los demás, dado que las plantas ya eran mayores en la situación inicial. El tratamiento 2 (*Paxillus involutus*) ocupa la segunda posición en altura en planta obtenida de raíz, mientras que en planta procedente de semilla y de cultivo *in vitro* ocupa posiciones intermedias. Resulta interesante para aumentar el crecimiento si bien no es comestible. El tratamiento 7 (*Lactarius controversus*) sólo ha sido probado en planta procedente de semilla, produciendo alturas medias y tampoco es comestible.

El tratamiento 3 (*Leccinum aurantiacum*+*Leccinum duriusculum*+*Paxillus involutus*): en planta procedente de raíz no es comparable mientras que en planta procedente de semilla produce muy buenos resultados en crecimiento. En planta procedente de cultivo *in vitro* es el que menor altura alcanza. También cuenta con la ventaja de su aprovechamiento micológico.

El tratamiento 4 (Testigo) ocupa posiciones medias-últimas en los tres tipos de planta, dado que no se ha inoculado ningún hongo simbionte y la planta depende de micorrizaciones accidentales.

El papel de las micorrizas puede tener mayor relevancia en la supervivencia de las plantas al trasladarlas al monte que en el crecimiento en altura, por lo que estos estudios deben continuar, explorando asimismo la permanencia de las especies inoculadas en las parcelas de campo, para poder valorar el interés de este método de cara al aprovechamiento de setas comestibles.

CONCLUSIONES

Si se buscan mejoras en el crecimiento, la mejor actuación en planta procedente de semilla o de estaquilla de raíz es inocular los hongos no comestibles (*Lactarius controversus* y *Paxillus involutus*), que producen crecimientos significativamente mejores. La inoculación simultánea con hongos comestibles supone un valor añadido a la planta obteniendo los mismos crecimientos. Si se busca mejorar el crecimiento de la planta obtenida mediante cultivo *in vitro* tiene mejores resultados la inoculación con *Leccinum aurantiacum*, que es el hongo simbiote más específico del temblón. Cabe destacar para finalizar y en general, que los hongos comestibles (*Leccinum aurantiacum* y *Leccinum duriusculum*), tanto juntos como aislados, no han producido crecimientos significativamente diferentes salvo con planta *in vitro*, pero cuentan con la ventaja de su aprovechamiento micológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la colaboración prestada por Luis Miguel Muñoz y Fernando Herrero Machón del vivero forestal de Calabazanos (Palencia), Ángel Muñoz López del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Palencia, Marina Fernández Toirán del Centro de Inv. For. de Valonsadero (Soria), Juan Andrés Oria de Rueda Salguero, Julio Díez Casero, Aurelio García Blanco de la Sociedad Micológica de Valladolid y Teresa Martín Villullas. Este estudio se engloba dentro del proyecto de investigación VA 40/99 financiado por la Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAEYENS LÓPEZ, A. (1991).- Chopos para el desarrollo. Ed. San Francisco. Zaragoza.

CRIPPS, C & ORSON, K. M. (1994).- A new *Cortinarius* from a mature aspen stand in Montana. *Mycotaxon*, Volume L, pp. 315-321.

DUÑABEITIA, M.K; HORMILLA, S; PÉREZ MORAL, E & PEÑA, J.I. (1991).- Actividades enzimáticas en Basidiomicetos formadores de ectomicorrizas en *Pinus radiata* D. Don. *Acta Botánica Malacitana*, 16 (1): 115-121. Málaga.

FERNÁNDEZ MOLOWNY, A. (1997).- Los chopos en la cuenca del río Duero. Ministerio de Medio Ambiente, Confederación Hidrográfica del Duero. Valladolid.

FOUCARD, J.C; (1997).- Viveros, de la producción a la plantación. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

HONRUBIA, M; TORRES, P; DÍAZ, G & MORTE, A. (1995).- Biotecnología Forestal: técnicas de micorrización y micropropagación de plantas. Servicio de publicaciones de la Un. de Murcia, Murcia.

OLIVER, J.M; GUINBERTEAU, J; RONDET, J & MAMOUN M. (1997).Vers l'inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles. *Revue forestière française* n° spécial 1997: Champignons et mycorhizes en forêt, pp. 222-234. Nancy.

PADRÓ SIMARRO, A. (1992).- Clones de chopo para el valle del Ebro. Diputación General de Aragón, Servicio de Investigación Agraria. Zaragoza.

PIERIK, FLM. (1990).- Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

PERA, J; PARLADE, J; ALVAREZ, I.F; (1994).- Eficacia del tipo de inóculo de *Pisolithus tinctorius* en la formación de micorrizas en *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii*. *Investigación Agraria. Sist. Recur. For.* Vol. 3 (1).