

ARTÍCULOS

**Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata***

Effect of inoculum type of three fungal species on the controlled mycorrhization of *Pinus radiata* seedlings

**Daniel Chávez M<sup>a\*</sup>, Guillermo Pereira C<sup>a</sup>, Ángela Machuca H<sup>a</sup>**

\*Autor de correspondencia: <sup>a</sup>Universidad de Concepción, Departamento Forestal, Laboratorio de Biotecnología de Hongos, Campus Los Ángeles, J. A. Coloma 0201, casilla 341, Los Ángeles, Chile, tel.: 56-43- 405293, fax: 56-43-314974, dachavez@udec.cl

SUMMARY

In the present study different types of inoculum: sporal (SI), solid micelial (SMI), and liquid micelial (LMI) of ectomycorrhizal fungi were evaluated on the controlled mycorrhization of *Pinus radiata* seedlings growing under experimental nursery conditions. The fungal species were *Rhizopogon luteolus*, *Suillus bellinii* and *Suillus luteus* collected from *Pinus radiata* plantations in the province of Bío Bío, in the VIIIth Region of Chile. The fungal species were cultivated on the solid medium MMN (modified Melin-Norkrans), pH 5.8, and incubated for 30 days to produce the sources of micelial inoculum under liquid (LMI) and solid (SMI) conditions. To obtain the SI the carpophores collected in field were cleaned (previous identification in the laboratory) and then crushed in blender (1000 rpm) containing desionized water. The different types of inoculum were kept in glass bottles, at 4° C in darkness, until their use. The results indicated that the effect of the type of inoculum changed according to the fungal species studied. The best results after eleven months for the plant mycorrhization were observed when SMI and LMI obtained from *R. luteolus* and LMI from *S. luteus* were used. The species *S. bellinii* did not present differences in the mycorrhization reached by the plants with the different types of inoculum. Among three species of ectomycorrhizal fungi studied, *R. luteolus* showed the biggest effects on the growth of the *P. radiata* seedlings in nursery.

*Key words:* ectomycorrhizal fungi, sporal inoculum, micelial inoculum, *Pinus radiata*.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la incidencia de diferentes tipos de inóculos (esporal IE, micelial sólido IMS y micelial líquido IML) de hongos ectomicorrícicos en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata* en condiciones experimentales de invernadero. Las especies fúngicas utilizadas fueron *Rhizopogon luteolus*, *Suillus bellinii* y *Suillus luteus*, recolectadas de plantaciones de *P. radiata*, en la provincia de Bío Bío, VIII Región, Chile. Las especies aisladas fueron cultivadas en medio de cultivo sólido MNM (Melin-Norkrans Modificado), pH 5,8, e incubadas durante 30 días para producir las fuentes de inóculos miceliales en condiciones líquidas (IML) y sólidas (IMS). Para obtener el IE se limpiaron los carpóforos recolectados en terreno (previa identificación en laboratorio) y luego se trituraron en una licuadora (1.000 rpm) con agua desionizada. Los diferentes tipos de inóculo fueron mantenidos en recipientes de vidrio, a 4° C en oscuridad, hasta su utilización. Los resultados obtenidos después de once meses indicaron que el efecto del tipo de inóculo varió según la especie fúngica. Para la especie *R. luteolus*, los mejores resultados de la micorrización de plantas fueron obtenidos con IMS e IML; en cambio, para *S. luteus* fue el IML. La especie *S. bellinii* no presentó diferencias en la micorrización alcanzada por las plantas con los diferentes tipos de inóculos aplicados. De las tres especies de hongos ectomicorrícicos estudiados, con *R. luteolus* fueron alcanzados los mayores efectos en el crecimiento de las plantas de *P. radiata* en vivero.

*Palabras clave:* hongos ectomicorrícicos, inóculo esporal, inóculo micelial, *Pinus radiata*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrícicos tienen una distribución limitada entre las especies vegetales. Sólo entre el 3 y 5% de los vegetales establecen este tipo de micorriza (Barea

1991, Honrubia *et al.* 1992); sin embargo, su importancia forestal es enorme no sólo por la amplia distribución de las familias de plantas de uso maderable con las que forman simbiosis, sino también por los diversos grupos fúngicos que desarrolla esta asociación (Honrubia *et al.* 1992, Smith

y Read 1997, Estrada-Torres y Santiago-Martínez 2003) y que incluye muchas especies comestibles. Desde el punto de vista biológico se puede definir a las micorrizas como asociaciones mutualistas entre ciertos hongos y las raíces de la planta, en la que ambos miembros de la asociación se benefician y participan activamente en el transporte y absorción de nutrientes, influyendo tanto en la estructura como en la estabilidad de las comunidades vegetales (Bolan 1991, Maldonado y Ramírez 1997, Miyasaka y Habte 2001). La mayoría de los hongos formadores de ectomicorrizas pertenecen a la subdivisión *Basidiomycotina* y *Ascomycotina*, e incluyen muchas de las especies, tanto de fructificación epigeas como hipógeas, que están presentes en los bosques (Pera y Parladé 2005). Varias especies de hongos ectomicorrícicos pueden ser cultivados en laboratorio para su posterior utilización en micorrizaciones controladas de plantas en vivero, siendo necesario determinar las condiciones y técnicas culturales que permitan la optimización de esta simbiosis hongo-planta. Por ello la adecuada selección de las especies de hongos micorrícicos como simbiosis y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de muchas especies vegetales en campo (Honrubia *et al.* 1992, Pereira *et al.* 2007). Dentro de este contexto, el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de tres tipos de inóculos, de tres especies fúngicas, en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata* D. Don, en vivero.

## MÉTODOS

*Hongos ectomicorrícicos.* Los hongos ectomicorrícicos utilizados en el estudio corresponden a las especies *Rhizopogon luteolus* Fr., *Suillus bellinii* (Inz.) Kuntze y *Suillus luteus* (L.) S.F. Gray, especies recolectadas en plantaciones de *P. radiata* de la provincia de Bío-bío, VIII Región, Chile (cuadro 1). Estos hongos fueron aislados y cultivados en laboratorio a partir de los cuerpos fructíferos e identificados de acuerdo a características macroscópicas y microscópicas

de éstos (Moreno *et al.* 1996, Valenzuela 1998, Gerhardt *et al.* 2000, Lazo 2001). El medio de cultivo utilizado fue Agar Melin-Norkrans modificado (MNM) (Marx 1969), con pH ajustado para 5,8, agregando HCl o KOH según correspondiera.

*Inóculo esporal (IE).* Para la producción del IE se procedió a limpiar los carpóforos recolectados en terreno (previa identificación en laboratorio) retirando la cutícula y cortando el pie en el caso de los hongos epigeos y sacando la tierra de los hongos hipógeos para luego fragmentarlos y triturarlos en una licuadora manual (1.000 rpm) marca Sindelen modelo L200, con agua desionizada. Posteriormente en cámara de conteo Neubauer se determinó la concentración de esporas a aplicar por planta ( $1 \times 10^7$  esporas por planta). Las suspensiones esporales fueron guardadas en recipientes de vidrio hasta su utilización ( $4^\circ$  C en oscuridad).

*Inóculo miceliar líquido (IML).* De los cultivos almacenados (colonias activas) de *R. luteolus*, *S. bellinii* y *S. luteus*, se retiraron cuatro discos de agar-micelio (5 mm de diámetro) por separado, para ser transferidos a matraces Erlenmeyer (100 mL) que contenían 60 mL de medio líquido MNM con pH ajustado para 5,8 tapados con paño de fibra sintética y papel kraft, previamente autoclavados a  $121^\circ$  C durante 15 minutos, en autoclave marca Huxley modelo HL-340. Posteriormente, los matraces fueron incubados en oscuridad a  $24 \pm 1^\circ$  C durante siete semanas en condiciones estáticas, sala de incubación, para luego la biomasa producida ser cosechada y triturada en licuadora manual con agua destilada (suspensión miceliar), la cual fue posteriormente utilizada como fuente de IML, con una dosis de 10 mL por planta en concentración de 1:10 v/v (1 mL de micelio fresco diluido en 10 mL de agua destilada).

*Inóculo miceliar sólido (IMS).* Para el IMS se utilizó como sustrato una mezcla de vermiculita y turba en proporción 10:2 v/v, la cual se depositó en frascos de vidrio de 160 mL, adicionando un volumen de 100 mL de medio líquido MNM modificado (glucosa  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), ajustado a pH 5,8.

**Cuadro 1.** Sitios de recolecta de los hongos, edad de la plantación y características del suelo.

Site of gathering, age of the plantation, and physical and chemical characteristics of the soils.

Especie de hongo	Nº Registro muestra	Sitio de colecta	Edad del rodal de <i>Pinus radiata</i> (años)	Características del suelo*
<i>Rhizopogon luteolus</i>	LBH-RI-05	Sector Paraguay 37° 22' 20" S, 72° 10' 29" O	10	Suelo arenoso, pH: 6,1; MO: 2,4 %; N: 1,3; P: 7; K: 48
<i>Suillus bellinii</i>	LBH-Sb-05	Sector Aeródromo 37° 22' 41" S, 72° 25' 30" O	15	Suelo arenoso-franco, pH: 5,6; MO: 2,3 %; N: 56; P: 9; K: 120
<i>Suillus luteus</i>	LBH-Sl-05			

\* MO: materia orgánica. Contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio (mg/kg de suelo seco), determinados como elementos disponibles.

Los frascos con las mezclas de sustrato humedecidas fueron tapados con paño de fibra sintética (Microsafe) y papel (kraft) para evitar contaminación y permitir, a su vez, una buena oxigenación, siendo autoclavados a 121° C por 15 minutos. Posteriormente, bajo cámara de flujo laminar marca Esco modelo AHC-3A1, se depositaron en la parte superior del sustrato 15 fragmentos de inóculo (5 mm de diámetro cada uno) de las especies *R. luteolus*, *S. bellinii* y *S. luteus*, según correspondiera. Los frascos fueron incubados en oscuridad a 24 ± 1° C durante 24 días en condiciones estáticas hasta su utilización.

*Inoculación de plántulas de Pinus radiata, con distintos tipos de inóculo.* Una vez que las semillas fueron germinadas en condiciones axénicas en cámara de cultivo, las plantas de *P. radiata* alcanzaron aproximadamente 5 cm de altura e iniciaron el crecimiento radicular secundario, se trasplantaron a contenedores individuales de 200 cm<sup>3</sup> cada uno, con una mezcla de sustrato (vermiculita, arena y turba en proporción 2:2:1 v/v), momento en el cual se inocularon las plantas con IE, IML e IMS, según correspondiera. Las especies *R. luteolus*, *S. bellinii* y *S. luteus* fueron aplicadas a las plántulas de *P. radiata*, tomando de la suspensión del IE 10 mL para ser aplicados con jeringa en tres puntos alrededor de las plantas, con una concentración de 1 x 10<sup>7</sup> esporas por planta. Para la aplicación del IML se procedió a tomar de la suspensión miceliar 10 mL para ser aplicados con jeringa en tres puntos alrededor de las plantas. Por otra parte, para la aplicación del IMS, en el tercio inferior del contenedor, se adicionaron 20 cm<sup>3</sup> de IMS por planta, quedando éste en contacto directo con el sistema radicular de la planta de *P. radiata*.

*Evaluación de atributos morfológicos en plantas de P. radiata transcurridos once meses de cultivo en invernadero.* Para determinar el crecimiento en altura se midieron con regla graduada cinco plantas de cada tratamiento desde la base de los contenedores hasta el ápice de las plantas para obtener el incremento en altura de *P. radiata*. Los valores de biomasa aérea fueron obtenidos cortando las plantas de *P. radiata* a nivel del DAC (diámetro a la altura del cuello). Por otra parte, el sistema radicular se extrajo de los contenedores y fue limpiado con abundante agua, tomando la precaución de no perder segmentos de raíces. Una vez obtenidas las muestras de biomasa aérea y biomasa radicular, fueron secadas a 60° C en estufa marca Jouan hasta obtener peso constante, determinando así la biomasa de cada una de dichas variables. Para los atributos morfológicos se trabajó con cinco repeticiones por tratamiento.

*Evaluación del estado micorrícico en plantas.* Para la evaluación del grado de micorrización que las plantas de *P. radiata* inoculadas alcanzaron en este estudio se utilizó la metodología de Giovannetti y Mosse (1980). Las raíces de las plantas anteriormente cortadas se colocaron sobre

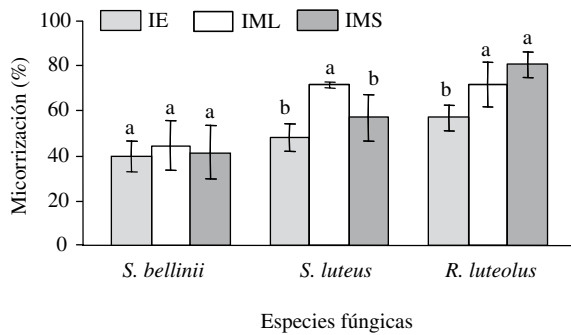
una placa de Petri, provista en su base de un sistema de cuadrícula, contabilizando bajo lupa de alta resolución marca Olympus modelo SZ2-ILST las intersecciones entre las raíces micorrizadas y los ejes de dicha cuadrícula (Brundrett *et al.* 1996). Esta forma de evaluación es conocida también como método de la gradilla, la cual entrega el porcentaje de raíces micorrizadas.

*Análisis estadístico.* Para determinar si el grado de micorrización de las raíces de las plantas depende de la especie fúngica empleada, del tipo de inóculo aplicado o de la efectividad de la especie, se utilizó un experimento factorial. Para comparar el efecto de los distintos tipos de inóculos sobre los porcentajes de micorrización, altura (cm), biomasa aérea (g) y radicular (g) de las plantas de *P. radiata* se aplicó un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorio. Para establecer los tratamientos en los que existieron diferencias estadísticas se aplicó la prueba de Tukey (Steel y Torrie 1989) para comparaciones múltiples con nivel de significancia de  $P < 0,05$ . Para ello se utilizó el software Statistica versión 6.0.

## RESULTADOS

*Grado de micorrización obtenido por las plantas de P. radiata con la aplicación de distintos tipos de inóculos.* Los resultados de la figura 1 indican que las plantas de *P. radiata* logran micorrización con las tres especies de hongos micorrícicos estudiados, independiente del tipo de inóculo empleado. Se observa que en general las especies que producen el mayor porcentaje de micorrización en plantas de *P. radiata* son *R. luteolus* y *S. luteus*, mientras que *S. bellinii* produce los menores porcentajes de micorrización. Por otra parte, los resultados indican que para *S. luteus* y *R. luteolus* se producen diferencias significativas en el grado de micorrización logrado por las plantas de *P. radiata* dependiendo del tipo de inóculo empleado. Se observa que utilizando IML de *S. luteus* se logra el mayor porcentaje de micorrización (71,4%), con diferencias significativas si se compara con el grado de micorrización logrado con la misma especie en el tratamiento IMS (56,9%) e IE (48,3%). Para *R. luteolus* el mayor grado de micorrización se logra con el tratamiento IMS (80,6%) e IML (71,8%), con diferencias significativas si se compara con el grado de micorrización logrado por las plantas de *P. radiata* utilizando IE (57,1%).

*Efecto de los tipos de inóculos empleados en el crecimiento en altura en plantas de P. radiata.* La inoculación de *P. radiata* en vivero tiene efecto positivo en el crecimiento en altura de las plantas (figura 2A). Se observa que para la especie *S. bellinii* los tratamientos IML (17,3 cm) e IMS (15,1 cm) estimularon el mayor crecimiento en altura de *P. radiata*, tratamientos que difieren significativamente si se comparan con el IE (13,8 cm) y control

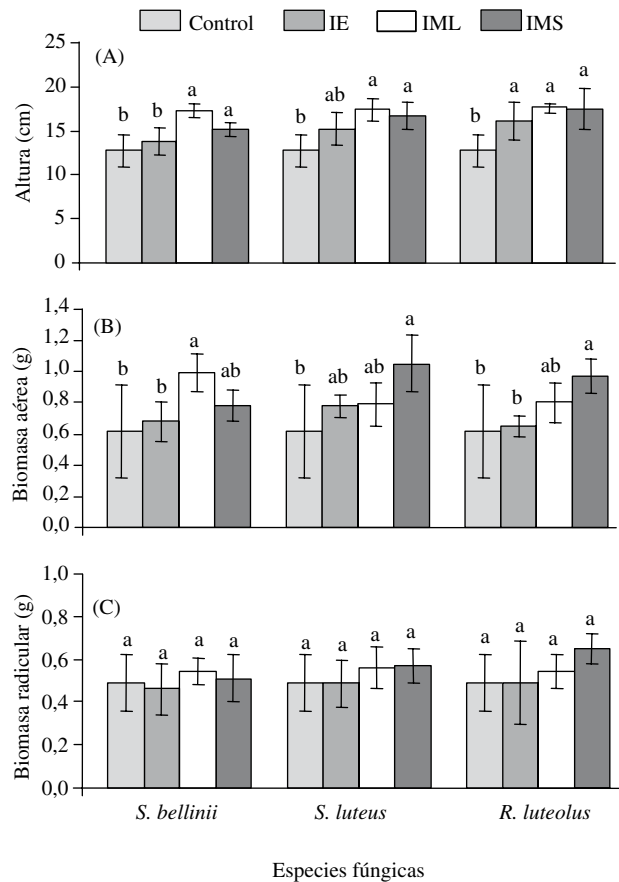


**Figura 1.** Porcentaje de micorrización obtenido en plantas de *Pinus radiata* con la aplicación de distintos tipos de inóculos en condiciones experimentales de vivero. Valores seguidos por la misma letra por especie no presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Percentage of mycorrhization obtained in seedling plants of *P. radiata* with application of different types of inoculum under experimental nursery conditions. Values followed by the same letter by species do not present significant differences ( $P < 0.05$ ).

(12,7 cm). Para *S. luteus* los tratamientos que tienen la mayor incidencia en el crecimiento en altura de plantas de *P. radiata* son el IML (17,4 cm) e IMS (16,7 cm), los cuales se diferencian significativamente en crecimiento si se comparan con el tratamiento control (12,7 cm). Para *R. luteolus* los diferentes tipos de inóculos empleados en la micorrización de las plantas de *P. radiata* tuvieron efecto significativo en el crecimiento en altura al compararlas con el tratamiento control.

*Efecto de los tipos de inóculos en la producción de biomasa aérea y radicular de las plantas de P. radiata en vivero.* Los resultados de la figura 2B muestran efectos positivos de la inoculación en la producción de biomasa aérea de *P. radiata*. Se observa que para *S. bellinii* el tratamiento IML (0,99 g) estimuló el mayor desarrollo aéreo de las plantas, el cual difiere significativamente si se compara con el tratamiento IE (0,68 g) y control (0,62 g). Para *S. luteus* el tratamiento que tuvo la mayor incidencia en el desarrollo aéreo de las plantas de *P. radiata* fue IMS (1,05 g), con diferencias significativas si se compara con el tratamiento control (0,62 g). Sin embargo, el tratamiento IMS no presentó diferencias significativas de crecimiento aéreo con IML (0,79 g) e IE (0,78 g). Para *R. luteolus* el tratamiento que estimuló el mayor desarrollo aéreo fue el IMS (0,97 g) el cual difiere significativamente si se compara con el tratamiento control e IE (0,62 y 0,65 g, respectivamente). Por otra parte, cuando las plantas de *P. radiata* son inoculadas en vivero con las especies *S. bellinii*, *S. luteus* y *R. luteolus* tienden a desarrollar más biomasa radicular al emplear IML e IMS. Sin embargo, a pesar de existir diferencias en valor absoluto entre algunos tratamientos, éstos no logran diferencias significativas a ningún nivel probado ( $P > 0,05$ ) (figura 2C).



**Figura 2.** Efecto de la micorrización en el crecimiento de altura (A), biomasa aérea (B) y biomasa radicular (C) de *Pinus radiata* con la aplicación de distintos tipos de inóculos en condiciones experimentales de vivero. Valores seguidos por la misma letra por especie no presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Effect of the mycorrhization in the growth of *P. radiata* seedlings: height (A), air biomass (B) and radicular biomass (C), with the application of different types of inoculum. Values followed by the same letter by species do not present significant differences ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

El porcentaje de micorrización logrado por las plantas de *P. radiata* en este estudio, y de acuerdo a la clasificación dada por Tateishi *et al.* (2003), se considera en general de medio a alto, logrando los mejores porcentajes de micorrización con la aplicación de los inóculos miceliarios. Al respecto, Pera *et al.* (1993) señalan que la aplicación de inóculos esporales con concentraciones de  $10^7$  esporas por planta asegura inóculo suficiente para establecer buenos niveles de micorrización. Sin embargo, los resultados de este estudio indican una baja incidencia en el grado de micorrización de plantas de *P. radiata* cuando se utilizó esta fuente de inóculo, independiente de la especie micorrízica probada.

Cuando se evaluó el efecto de la inoculación a los once meses en la morfología de *P. radiata*, existió una clara variación interespecífica en las respuestas del crecimiento.

La especie *R. luteolus* produjo efectos significativos en el crecimiento en altura de *P. radiata* con los tres inóculos probados, respecto del tratamiento control, resultados que se correlacionan con los presentados por la especie fúngica en condiciones controladas de laboratorio a pH 5,8 (Chávez *et al.* 2007) y a distintos niveles de pH (4,8, 5,8, 6,8 y 7,8) (Pereira *et al.* 2007). Para las especies *S. luteus* y *S. bellinii* en al menos uno de los tres tipos de inóculo probados resultó ser semejante al control. Ensayos similares en pino oregón (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) y *P. radiata* han demostrado la influencia positiva de *Rhizopogon sp.* en el desarrollo aéreo de las plantas (Chu-Chou y Grace 1985). Cabe destacar que en evaluaciones preliminares realizadas a los seis meses de instalados los ensayos no se observaron diferencias en los parámetros morfológicos entre las plantas control y las plantas micorrizadas. Al respecto, Molina (1980) y Martínez *et al.* (2007) afirman que, en general, en sustrato artificial y con aportes de fertilización adecuada, la micorrización en los primeros meses no produce diferencias de crecimiento significativas. Por otra parte, muchos de los beneficios de la simbiosis sobre la planta hospedera no se observan en un espacio tan reducido como en un contenedor, sino en el sitio de forestación, que es donde la micorrización muestra sus efectos. Estudios realizados por Wallander (1992) y Martínez *et al.* (2007) han demostrado que la fertilización también puede afectar a los hongos indirectamente, puesto que la asimilación de nutrientes consume energía y carbohidratos, lo cual puede reducir el carbono disponible para el desarrollo de la cepa fúngica. Altos niveles de nitrógeno y fósforo reducen la cantidad de carbohidratos en las raíces a niveles demasiado bajos para mantener al hongo simbiote. Estudios realizados por Martínez *et al.* (2007) demostraron que en periodos de falta de fertilización (letargo) la micorrización logra su mayor colonización.

Por otra parte, la inoculación tuvo incidencia en el desarrollo aéreo de las plantas, mostrando que para *R. luteolus*, *S. bellinii* y *S. luteus* la mayor producción de biomasa aérea se obtuvo con la aplicación de inóculos miceliarios, potenciando a las plantas a poder desarrollar mayor actividad fotosintética.

## CONCLUSIONES

El efecto del tipo de inóculo sobre la planta micorrizada varía según la especie fúngica estudiada. Para *R. luteolus*, el inóculo más efectivo para obtener plantas micorrizadas es el IMS e IML; en cambio, para *S. luteus* es el IML. *Suillus bellinii* no presentó diferencias en la aplicación de los distintos inóculos, por lo que se recomienda utilizar el IE tomando en consideración el bajo costo y la facilidad de su preparación. Dosis de aplicación de 20 mL por planta, en el caso del inóculo miceliar sólido (IMS), y de 10 mL por planta de inóculo miceliar líquido (IML)

se consideran volúmenes adecuados para la obtención de plantas micorrizadas en vivero. De las tres especies de hongos ectomicorrícicos estudiados, *R. luteolus* estimuló los mayores efectos en el crecimiento de las plantas de *P. radiata* en vivero. Sin embargo, se recomiendan inoculaciones con las especies del género *Suillus* por los beneficios económicos adicionales que la futura cosecha de los carpóforos de estos hongos comestibles en el bosque pueda presentar para agroforestadores.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el proyecto FONDECYT 1030620 y al Proyecto DIUC N° 204.415.005-1.0.

## REFERENCIAS

- Barea JM. 1991. Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Advances in Soil Science* 15: 1-40.
- Bolan NS. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Journal Plant and Soil* 134: 189-207.
- Brundrett M, N Bougher, T Grove, N Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra. ACIAR. 374 p.
- Chávez D, G Pereira, A Machuca. 2007. Crecimiento *in vitro* de cuatro especies de hongos ectomicorrícicos recolectados en plantaciones de *Pinus radiata*. *Agrociencia* 23(2): 79-84.
- Chu-Chou M, L Grace. 1985. Comparative efficiency of the mycorrhizal fungi *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon* species on growth of radiata pine seedlings. *Journal of Botany* 23: 417-424.
- Estrada-Torres A, G. Santiago-Martínez. 2003. Avances en el Estudio de la Ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. 76 p.
- Gerhardt E, J Vila, X Llimona. 2000. Hongos de España y de Europa. Barcelona, España. Omega. 957 p.
- Giovannetti M, B Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytology* 84: 489-500.
- 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.
- Lazo W. 2001. Hongos de Chile. Atlas micológico. Santiago, Chile. Salesianos. 223 p.
- Maldonado JM, GA Ramírez. 1997. Efecto de la inoculación con hongos micorrizógenos en almácigos de café (*Coffea arabica*) variedad Colombia. Tesis Ingeniero Agrónomo. Medellín, Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. p. 3-83.
- 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* 28(3): 226-233.
- Marx DH. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I.

- Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.* 59: 153-163.
- Miyasaka S, M Habte. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. *Soil Science Plant Anal.* 32: 1101-1147.
- Molina R. 1980. Ectomycorrhizal inoculation of containerized western conifer seedlings. Pacific North West and Range Experimental Station, USDA-Forest Service. Estados Unidos. 5 p. Research note PNW-357.
- Moreno B, F Jiménez, J Gómez, F Infante. 1996. Setas de Andalucía. Manual de identificación. Sevilla, España. Junta de Andalucía. 376 p.
- Pera J, IF Álvarez, J Parladé. 1993. Selección de hongos ectomicorrícicos para *Pinus pinaster* Ait. I Congreso Forestal Español, Lourizan junio de 1993. Ponencias y comunicaciones. Tomo III. p. 391-396.
- 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, Sistema y Recursos Forestales* 14(3): 419-433.
- 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(3): 215-219.
- Smith SE, DJ Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Cambridge, UK. Academic Press. 605 p.
- Steel R, J Torrie. 1989. Bioestadística: Principios y procedimientos. México DF, México. 2ª ed. McGraw Hill. 662 p.
- Tateishi T, K Yokoyama, N Konho, 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(4): 641-645.
- Valenzuela E. 1998. Guía de campo para setas (Agaricales) de la Isla Teja, Valdivia. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. 50 p.
- Wallander H. 1992. Regulation of ectomycorrhizal symbiosis in *Pinus sylvestris* L. Influence of mineral nutrition. Ph.D. Thesis. Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences, University Uppsala. 57 p.

Recibido: 03.07.08  
Aceptado: 20.11.08