



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería de Montes

Micorrización *in vitro* de *Leccinum
aurantiacum* (Bull.) sobre *Populus
tremula* (L.)

Alumna: Marina Mármol Martínez

Tutora: Rosario Sierra de Grado
Cotutora: Olaya Mediavilla Santos

Julio de 2019

Copia para el tutor

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primera instancia a mi tutora, Rosario Sierra de Grado, por ser la persona que me ha brindado la oportunidad de comenzar mi camino en el mundo de la investigación y por haberse implicado tanto en mi trabajo y en la orientación del mismo. Me gustaría dar las gracias también a sus valiosas correcciones y meticulosas, así como su disponibilidad a la hora de realizar todas mis consultas.

En segundo lugar, pero no menos importante, agradecer a mi cotutora Olaya Mediavilla Santos por haber seguido con constancia e implicación todo el largo recorrido que ha supuesto la realización de este trabajo. No sé cómo expresar toda la gratitud que siento por todas las horas que ha invertido en este proyecto y todos los conocimientos que me ha ido transmitiendo a lo largo del tiempo. Sin duda alguna, tanto Rosario como Olaya son y serán siempre dos investigadoras dignas de mi admiración.

A Valentín Pando Fernández por brindarme toda la ayuda que estaba en su mano en los análisis estadísticos realizados, así como su completa implicación en mi asesoramiento.

A mi madre, Josefa Martínez Estévez, por ayudarme a mejorar mi redacción a pesar de suponer un esfuerzo extra por no tener conocimientos relacionados con mis estudios.

A mi padre, Gabriel Mármol Criado, que junto con mi madre, me han apoyado en todo este largo recorrido de formación profesional, haciendo posible que me pudiera ir a estudiar a Palencia.

A Aitor Márquez, Borja Duque, Elisa Correa, y Pablo Pino, mis mejores amigos, por aguantarme y apoyarme en todo momento. Me habéis enseñado a no perder las esperanzas y darme por vencida.

A todos los profesores que, apasionadamente, me han guiado hasta donde estoy actualmente y me han motivado a seguir estudiando.

ÍNDICE

0	Resumen.....	2
1	Introducción	4
2	Objetivos	10
3	Materiales y métodos.....	11
3.1	Material vegetal.....	11
3.2	Metodología de inoculación del micelio	13
3.2.1	Inóculo fúngico.....	14
3.2.2	Micorrización	15
3.2.3	Verificación de la micorrización	17
3.3	Metodología de inserción de la planta.....	17
3.4	Diseño experimental.....	19
3.5	Mediciones	20
3.6	Análisis estadístico.....	24
4	Resultados.....	27
4.1	Detección de las micorrizas.....	27
4.2	Crecimiento en altura	27
4.3	Evolución del número de hojas.....	32
4.4	Variable longitud de la raíz más larga	36
4.5	Variable biomasa aérea	37
4.6	Variable biomasa radical.....	38
4.7	Modelo logístico de la variable estado de vigor.....	40
4.8	Análisis de la variable categórica color	41
5	Discusión	43
6	Conclusiones.....	47
7	Bibliografía	48
8	Anejo	52

0 RESUMEN

El álamo temblón (*Populus tremula*) es una especie forestal de gran interés tanto por sus cultivos comerciales para producción de madera o biomasa como por su papel en la restauración forestal. En asociación con hongos ectomicorrícicos, como es en el caso del boleto anaranjado (*Leccinum aurantiacum*), permite un doble aprovechamiento por la producción complementaria de setas silvestres comestibles. A pesar de la gran viabilidad que proporciona el cultivo de la especie *P. tremula* económicamente, existen muy pocos estudios relacionados con su micorrización. Los objetivos de este estudio fueron inducir la micorrización *in vitro* junto con la definición de su protocolo y la influencia del tiempo de incubación del micelio en la síntesis de micorrizas. Los resultados obtenidos fueron todo lo contrario a lo esperado, pues no se obtuvo evidencia alguna de presencia de micorrizas en las raíces de las plantas inoculadas con *L. aurantiacum* y el crecimiento de éstas fue menor que las no inoculadas en las variables longitud del tallo, número de hojas final, color, biomasa aérea y radical. Por otro lado, se observó que el tiempo de incubación del micelio propuesto para uno de los tratamientos afectó de forma significativa al crecimiento y desarrollo del huésped, obteniendo mejores resultados que el micelio no incubado en todas las variables y a las plantas control en las variables crecimiento en altura y estado de vigor. A pesar de que los resultados no fueron del todo satisfactorios, queda en evidencia que el hongo y la planta han interactuado entre sí.

Palabras clave: *in vitro*, ectomicorriza, setas comestibles

0 ABSTRACT

European aspen (*Populus tremula*) is one of the most important productive forest species on Earth. Its role in forest restoration and the economic importance is well known in the forestry world. In association with an ectomycorrhizal fungi, which is the case of Red-cap boletus (*Leccinum aurantiacum*), it allows another complementary exploitation: edible mushrooms. Unfortunately, there are very few studies related to its mycorrhization. The aim of this work was to induce *in vitro* mycorrhization, the definition of their protocol and the mycelium's time incubation influence in the synthesis of mycorrhizas. Since no evidence of the presence of mycorrhiza was obtained from root analysis, our results were the opposite of what we have expected. Plant growth was affected by the ectomycorrhiza, having a inferior means on the stem length, final leaf number, color and biomass. Despite of this failure, it was observed that mycelium's time incubation used in one of the treatments was significantly affected the development and growth of the host, obtaining better height growth and health state results that the non-incubated ones. Due to this evidence, was clear that the two species have interacted.

Key words: *in vitro*, ectomycorrhiza, edible mushroom.

1 INTRODUCCIÓN

Populus tremula L., comúnmente conocido como álamo temblón, es un árbol de la familia *Salicaceae* con una amplia distribución por toda Europa y Asia septentrional, generalmente en condiciones de climas atlánticos y boreales (**Fig. 1**). Es la angiosperma más ampliamente extendida por la Tierra y, junto a las gimnospermas *Pinus sylvestris* y *Juniperus communis*, es la planta leñosa con mayor rango de distribución (López Almansa & Martín García, 2014).



Figura 1. Mapa de distribución de la especie *Populus tremula* en Europa (Izq.). Rodal de *Populus tremula* situado en una zona con humedad edáfica junto a un cauce (río Ullaque) en la localidad de Narros del Puerto (Der.). Fuentes: EUFORGEN (2009), López Almansa & Martín García (2014).

En España esta especie se localiza formando bosquetes (**Fig. 1**) de superficie variable en los sistemas montañosos de la mitad norte de la península ibérica, en zonas de ribera. Aparece en El Pirineo, Sistema Ibérico y Central, Cordillera Cantábrica y Galicia (**Fig. 2**). Situándose desde casi el nivel del mar hasta los 1.800 metros de altitud en el Sistema Central (Alba, 2000).



Figura 2. Mapa de distribución de la especie *Populus tremula* en la península ibérica. Fuente: Especies forestales de España (2019).

Este álamo tiene un alto interés forestal, tanto desde el punto de vista de la conservación como de producción. Por su carácter colonizador, puede ser utilizado en la restauración forestal de áreas montañosas, degradadas, erosionadas o abandonadas por la población; también tiene un gran valor en la estabilización y protección de canchales y laderas de montaña; por último, aumenta la biodiversidad en repoblaciones forestales. Además, la producción de madera de *P. tremula*, considerada como buena desde el punto de vista tecnológico, podría ser interesante como fuente de rentabilidad económica dado su aprovechamiento y su corto turno para la producción de biomasa. Por contrapartida, el álamo temblón es una especie muy poco utilizada en viveros y repoblaciones porque se desconocen muchos aspectos de su ecología y manejo (Sierra de Grado, 2003).

Actualmente algunos autores dicen que esta especie parece tener problemas reproductivos, puesto que da pocas semillas fértiles y, además, posee una breve facultad germinativa y, como consecuencia de lo anterior, se reproduce principalmente de forma asexual con un claro predominio de pies masculinos (que presentan mayor capacidad regenerativa). Esto, a la larga, podría conducir a la desaparición de los pies femeninos y la capacidad de reproducción sexual (López Almansa & Martín García, 2014). Sin embargo, más bien parece que las condiciones climáticas influyen mucho en la abundancia de la floración: si los veranos son secos y cálidos y los inviernos fríos, se favorece la floración de la siguiente primavera, pero los veranos templados y húmedos la reducen (Easton, 1997; Sierra de Grado et al., 2003; Worrell et al., 1999).

Prospecciones en Castilla y León también han revelado una mayor frecuencia de rodales masculinos que femeninos o mixtos (Sierra de Grado et al., 2003).

Respecto a la propagación vegetativa, el estaquillado de rama es difícil de lograr en esta especie; el brote de estaquillas de raíz tiene mayor porcentaje de éxito pero el material de partida es muy laborioso de conseguir si viene del campo, se requiere tener plantas madre en macetas (Martínez Zurimendi et al., 2003). Es por ello que la técnica de micropropagación de cultivo *in vitro* podría ser de especial interés para poder producir esta especie de forma controlada (Gómez et al., 2014).

A través del cultivo *in vitro*, las plantas tienen la capacidad de producir su crecimiento a partir de células aisladas (Haberlandt, 1902). Existe un amplio grupo de técnicas, mediante las cuales a partir de un explante (protoplasto, célula, tejido u órgano), cultivado de forma aséptica en un medio con una composición química conocida y en condiciones ambientales controladas, se multiplican las plantas vegetativamente (Mroginski & Roca, 1991). El tipo de técnica a emplear dependerá en gran medida del tipo de explante con el que se trabaje.

Se ha conseguido reproducir vegetativamente un gran número de especies forestales *in vitro*, como por ejemplo: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Quercus suber*, *Schinus molle*, *Populus alba* y *Populus nigra* entre otros (Alba, 2000; Ayala, 2011; Martínez et al., 2005; Toribio & Celestino, 1989).

No obstante, se debe tener en cuenta que a pesar de los múltiples beneficios que presentan estas técnicas, también existen una serie de dificultades (Martínez Zurimendi et al., 2003):

- Instalaciones costosas: lo que hace que no se justifique su uso en numerosas especies que se multiplican fácilmente (**Fig. 3**).
- Conocimiento de las técnicas de cultivo: cualquier error se multiplica a gran escala.
- Posibilidad de producirse variaciones genéticas y fenotípicas.

Por otro lado, existen varias aplicaciones muy interesantes asociadas a la propagación por cultivo *in vitro*, como por ejemplo:

- Obtención de plantas libres de patógenos.
- Propagación de plantas.
- Conservación e intercambio de germoplasma.
- Bioconversión y producción de compuestos útiles.



Figura 3. Instalaciones utilizadas para el crecimiento de los cultivos *in vitro* de este proyecto (izq.). Detalle del cuadro de mandos de la cámara de cultivo *in vitro* (der.).

El empleo de estas técnicas ya se ha realizado anteriormente en especies con problemas de propagación, como es el caso de *Legrandia concinna*, la cual obtuvo resultados exitosos consiguiendo multiplicar y preservar esta especie a partir de yemas axilares (Uribe & Cifuentes, 2004). Así como la especie *Agave inaequidens* que, a partir de brotes, se logró desde una mayor altura de la planta, más hojas y brotes, hasta un desarrollo radical más rápido (Aureoles Rodríguez et al. 2008).

La formación de micorrizas en especies forestales es especialmente importante debido a que es esencial para el crecimiento y supervivencia de la mayoría de plantas en un ecosistema natural. Dependiendo de la especie y la fuerza del hongo micorrízico que infecta, otorga unos tipos y cantidades diferentes de beneficios como los nombrados anteriormente con la especie *Agave inaequidens* (Chung Guin-po, 2005). Más concretamente, los hongos ectomicorrízicos, tienen la capacidad de aumentar la habilidad de conseguir agua y nutrientes para la planta, particularmente bajo condiciones ambientales de estrés (MA et al., 2008). Proporcionan fósforo, potasio,

nitrógeno y otros nutrientes movilizados que proceden de la materia orgánica presente en el suelo aunque no es accesible para las plantas. A cambio, éstos reciben derivados de los carbohidratos fotosintetizados por ellas (Szuba, 2015). Aislarlos, cultivarlos y producirlos en masa sería el principio de las plantaciones comerciales con doble aprovechamiento (maderero o de biomasa junto con las setas silvestres), en este ámbito de estudio, que se está desarrollando actualmente, existen muy pocas especies que han sido objeto de análisis (Morcillo & Sánchez, 1996).



Figura 4. Cultivo *in vitro* realizado en el laboratorio para el presente proyecto de *Leccinum aurantiacum* sobre *Populus tremula*.

Mediante la combinación de técnicas de propagación *in vitro* y el empleo de métodos de micorrización es posible favorecer, como se ha comentado en el párrafo anterior, un mejor desarrollo de la planta. De este modo, aprovechando el ambiente aséptico y controlado del cultivo *in vitro*, se podría introducir un inóculo de forma controlada, así se asegura exclusivamente su presencia en la raíz de la planta (**Fig. 4**).

En este sentido, varios investigadores han realizado ensayos de micorrización obteniendo resultados positivos en el desarrollo de la planta. Por ejemplo, Burgess et al. (1996) lograron sintetizar *in vitro* la ectomicorriza del género *Pisolithus* sobre *Eucalyptus grandis* con éxito, consiguiendo: duplicar el número de raíces laterales, madurar en un plazo menor de tiempo y emerger éstas más cerca del ápice de la raíz primaria que las no inoculadas. Morte et al. (1994) consiguieron micorrizar plantas micropropagadas de *Helianthemum almeriense* con *Terfezia clavertyi* (trufa del desierto), obteniendo una tasa de supervivencia mayor. Por último, Mediavilla et al. (2016) inocularon *Boletus edulis* sobre *Cistus ladanifer*, logrando un mayor crecimiento que las plantas no inoculadas.

En España existe una importancia económica de la producción de setas que no es nada desdeñable, ya que en muchos casos supera a los ingresos de la producción maderera y, en cualquier caso, supone un complemento muy importante en la economía familiar de algunas zonas rurales (Oria de Rueda et al., 2008; Sierra et al., 2002). La obtención potencial de setas comestibles asociadas a una plantación de álamo temblón podría considerarse como un aprovechamiento complementario, sostenible y viable económicamente.

Se han realizado algunos estudios de micorrización con *P. tremula*, como es el caso de (Cripps & O. K. Miller, 1995), donde se inocularon *in vitro* los hongos *Inocybe lacera* y *Amanita pantherina* sobre el álamo temblón con resultados positivos. En contrapartida, realizaron inoculaciones sin éxito con los hongos *Chalciporus piperatus* y *Piloderma croceum*, donde este último formó un manto hifal pero no una red de Hartig como *I. lacera* y *A. Pantherina*. Langer et al. (2008) expuso, además, la necesidad de estudiar el álamo temblón en el ámbito de las micorrizas, pues es una especie muy poco estudiada hasta la actualidad.

Navas Gil (2003) consiguió inocular sobre *P. tremula* dos hongos comestibles (*Leccinum duriusculum* y *L. aurantiacum*) y dos no comestibles (*Paxillus involutus* y *Lactarius controversus*), obtuvo: un porcentaje de micorrización similar en todos los tratamientos, en torno a un 67%; crecimiento superior de las plantas micorrizadas tanto en altura como en diámetro, sobre todo con plantas obtenidas de semilla o por estaquilla; y una mayor tasa de supervivencia de la planta procedente del cultivo *in vitro* en la fase de aclimatación.

El boleto anaranjado (*Leccinum aurantiacum*) es un hongo ectomicorrícico de la familia *boletaceae* que se asocia a una amplia gama de árboles hospedantes (Den Bakker et al., 2004) como es el caso del *P. tremula*. Éste fructifica en verano y otoño en suelos ricos de bosques planifolios, en suelos ácidos y básicos, con chopos, robles y abedules. Su uso gastronómico no es desdeñable, sobre todo los ejemplares jóvenes (Martínez, 2017).

Recientemente un compañero de la UVA, Pablo Fernández, experimentó ya con las especies propuestas en este estudio con varios tipos de inoculación. No encontró presencia de micorrizas pero sí indicios de mayor crecimiento en las plantas inoculadas. Por ello, se ha planteado elegir un tipo de inoculación y probar cómo afecta la incubación del micelio al crecimiento de los huéspedes.

La obtención de plantas de *P. tremula* propagadas *in vitro* y micorrizadas con *L. aurantiacum* permitiría potenciar el aprovechamiento de esta especie, así como la posible explotación de hongos comestibles asociados a esta planta.

Tras analizar, estudiar y citar la bibliografía revisada en este apartado, las hipótesis del presente estudio son las siguientes:

- Si se trabaja en un ambiente estéril como es el cultivo *in vitro*, se asegurará la presencia de *L. aurantiacum* en el sustrato de cada unidad experimental.
- Al estar el inóculo en contacto con el sistema radical de los explantes de *P. tremula* se espera que haya una síntesis de micorrizas en los ápices de las raíces.
- Las plantas micorrizadas presentarán un crecimiento mayor, tanto aéreo como radical.
- La incubación del micelio de *L. aurantiacum*, bajo condiciones óptimas para su desarrollo, mejorará el proceso de síntesis de micorrizas.

2 OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivos:

1. Inducir en plantas de *Populus tremula* la micorrización *in vitro* con *Leccinum aurantiacum*.
2. Definir un protocolo de micorrización *in vitro* viable para estas especies y testar la influencia del tiempo de cultivo del micelio en la micorrización.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para la realización del presente estudio se han utilizado plantas de la colección de clones de *Populus tremula* L. con las que cuenta la Universidad de Valladolid en el campus de Palencia. Para obtener material vegetal suficiente se ha realizado una multiplicación *in vitro* de los clones 8 y 10 de la colección procedentes de las provincias de Palencia y Segovia respectivamente (**Tabla 1**). El proceso se resume de la siguiente forma:

1. Establecimiento en cultivo aséptico: los explantes (en este caso yemas axilares) se transfirieron al medio de cultivo de forma aséptica, convenientemente desinfectados tanto el explante como el medio de cultivo.
2. Proliferación: se realizó una multiplicación en cascada, dando lugar a numerosos nuevos tallos clonados (**Fig. 5**). Esta fase fue controlada por la presencia de citoquininas que potenciaron la formación de nuevos brotes más que su elongación. Duró 2 meses esta fase y se comenzó en junio de 2018.

La proliferación se hizo utilizando el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 0,88 mg/l BAP, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar. Las plantas crecieron, tanto en esta fase como en la siguiente, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo un fotoperiodo de 16 horas con una intensidad de luz de 2.000 luxes proveniente de lámparas fluorescentes de luz fría.



Figura 5. Detalle de los tarros utilizados para proliferación (izq.) y enraizamiento (der.).

3. **Enraizamiento:** en los brotes obtenidos en la etapa anterior se individualizaron las yemas apicales para conseguir el desarrollo de raíces en cada uno de ellos *in vitro* (**Fig. 5**). Para ello se redujo la presencia de citoquininas en el medio y se aumentó la concentración de auxinas. Esta etapa en el género *Populus* también duró alrededor de dos meses y el enraizamiento se elaboró en octubre de 2018.

En este caso el medio de cultivo ACM (Aspen Culture Medium) estaba suplementado con 0,49 μm de IBA.

4. **Micorrización:** una vez que las plantas presentaban un buen sistema radical al que asociar el micelio, fueron trasladadas a un nuevo medio de cultivo: el Modified Melin-Norkans (MMN) (**Fig. 6**). Se procedió a micorrizar a partir del mes de enero.



Figura 6. Sustrato recién inoculado con micelio de *Leccinum aurantiacum* junto con el explante de *Populus tremula*.

En la siguiente tabla se muestran los clones utilizados en el experimento:

Tabla 1. Procedencia del material vegetal utilizado.

Número de clon	Código	Provincia	Localidad
8	MAN	Palencia	Mantinos
10	RIA	Segovia	Santa María de Riaza

Tras el primer mes de crecimiento, algunas plantas mostraron alturas muy cercanas a la máxima que les proporcionaba el tarro de cristal utilizado como recipiente. Se optó por añadir otro tarro colocado de forma vertical e inversa a los que se estaban ya utilizando, proporcionando así el suficiente espacio para el crecimiento de las plantas.

3.2 Metodología de inoculación del micelio

Los materiales requeridos para la inoculación del micelio en los tarros de vidrio con o sin planta son los siguientes:

- Batidora
- Jeringuilla de plástico de 60 ml.
- Mechero Bunsen.
- Micelio de *Leccinum aurantiacum*.
- Parafilm.
- Tapones de plástico.
- Tarros de vidrio con 75 ml del medio MMN esterilizados.
- Varilla de metal.
- Vaso de precipitado de 2 litros cerrado con papel de aluminio.

3.2.1 Inóculo fúngico

Los esporocarpos de *Leccinum aurantiacum* fueron recogidos de plantas de *Populus tremula* localizadas en Stresa (Italia) en septiembre de 2012. Fueron almacenados en una bolsa cerrada de polietileno hasta su aislamiento en el laboratorio.

El aislamiento se realizó bajo condiciones de asepsia con el fin de evitar cualquier posible contaminación. Una pequeña parte del micelio se introdujeron en placas con medio nutritivo MMN (Modified Melin-Norkans) (Marx, 1969) con un pH de 5,5 (**Tabla 2**), creciendo a 22-24°C en condiciones de oscuridad (Honrubia et al., 1994). Una vez que el micelio se encontraba lo suficientemente desarrollado, fue transferido a nuevas placas con medio MMN para asegurar su vitalidad y crecimiento.

Tabla 2. Compuestos y cantidades necesarias para realizar medio de cultivo MMN por cada litro de agua.

Modified Melin-Norkans	
Malta	3 g
Glucosa	10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 g
CaCl ₂	0,05 g
NaCl	0,025 g
FeCl ₃ al 1%	1,2 ml
Tiamina	1 ml
Agua destilada	1 l
Relación del volumen de turba-vermiculita	11:1
Volumen turba-vermiculita/Volumen líquido	2/1

*El pH de dicha disolución se debe ajustar a 5,5.

El medio de cultivo, formato sólido, consistió en una mezcla de turba y vermiculita (11/1; v/v) mezclado con medio MMN líquido a un pH de 5,5 y un contenido en glucosa reducido a 2,5 g/l. El ratio de sustrato sólido mezclado con el líquido fue de 2/1 (v/v). Este sustrato fue transferido a tarros de cristal y luego esterilizados a 121°C por 20 minutos. Una vez enfriados, los tarros fueron inoculados con *Leccinum aurantiacum*.

3.2.2 Micorrización

Se realizaron 3 tratamientos de inoculación, que fueron los siguientes:

- **Tratamiento de inoculación 1:** el micelio se inoculó en el sustrato un mes antes de la introducción de la planta, y se incubó a 22°C en condiciones de oscuridad durante ese tiempo.
- **Tratamiento de inoculación 2:** El micelio se inoculó a la vez que se introdujo la planta en el tarro de vidrio que contenía el sustrato.
- **Tratamiento de inoculación 3:** Se introdujo la planta en los tarros de vidrio que contenían el sustrato sin llevar a cabo ningún tipo de inoculación.

La metodología utilizada para la micorrización, procurando la esterilidad en todos los pasos, es la siguiente:

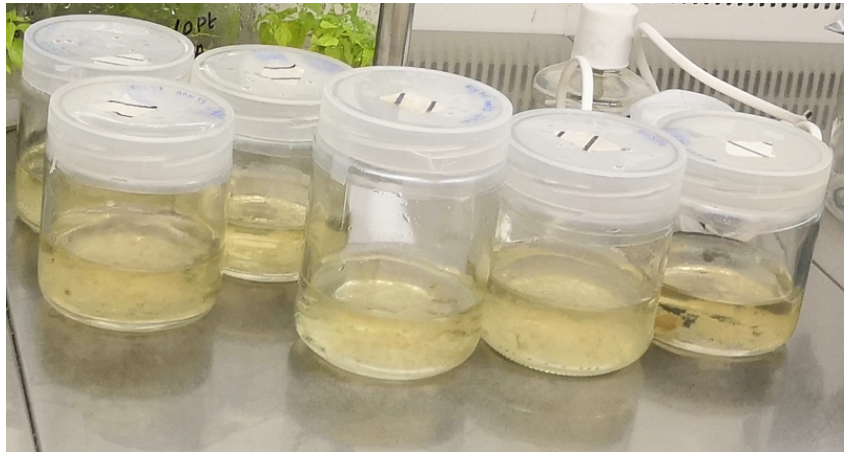


Figura 7. Detalle de diferentes cultivos de *Leccinum aurantiacum* utilizados en la inoculación.

1. Mezclado de los diferentes cultivos de micelio. Debido a que el micelio a utilizar se encontraba dividido en diferentes tarros de plástico de cultivos diferentes (**Fig. 7**), y como se quería conseguir una inoculación homogénea del micelio, se introdujeron 800 ml de ese micelio a un vaso de precipitado para luego ser mezclados con la batidora (**Fig. 8**). El batido fue muy leve pues no se quiso romper el micelio excesivamente.

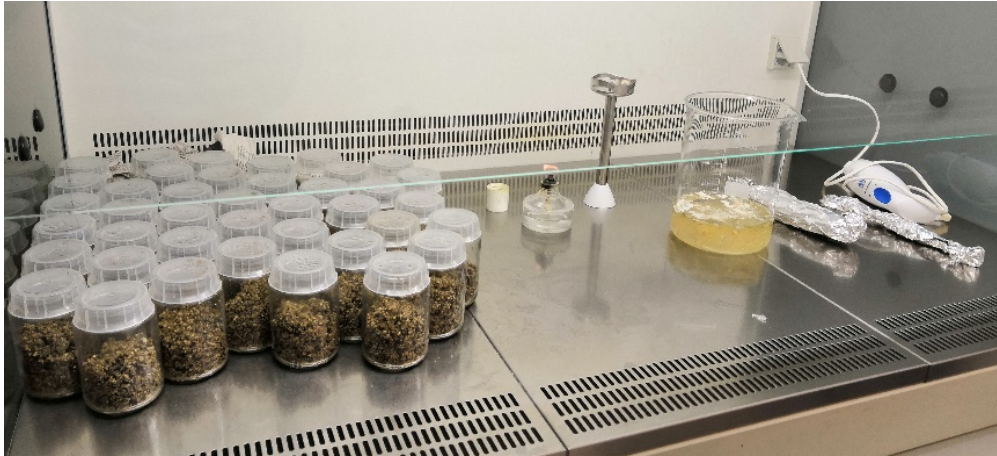


Figura 8. Cámara de flujo laminar con los materiales necesarios para la inoculación del micelio.

2. Inoculación del micelio en los tarros de vidrio. Con la varilla de metal se homogeneizó la mezcla en cada toma, preparando 6 contenedores de vidrio para cada una, inoculando 10 ml en cada tarro. Una vez cerrados los tarros, son agitados para asegurar que el micelio se mezcle por todo el medio de cultivo.



Figura 9. Tarros inoculados envueltos en papel de periódico para su incubación durante un mes en la cámara de cultivo *in vitro*.

3. Incubación del micelio. Los tarros de vidrio inoculados fueron envueltos, de cuatro en cuatro, en papel de periódico para mantenerlos en completa oscuridad (**Fig. 9**) y se dejaron reposar en la cámara de cultivo *in vitro* a 24°C para su incubación durante un mes.

En el caso del tipo de inoculación 2, donde el micelio es inoculado a la vez que se introduce la planta en el contenedor, se realizaron dos operaciones diferentes: inserción de la planta e inoculación.

3.2.3 Verificación de la micorrización

Después de tres meses desde la inoculación, las plantas se extrajeron cuidadosamente de los tarros y las raíces fueron limpiadas de acuerdo con la metodología establecida por Fischer y Colinas (1997). Todas las plantas inoculadas fueron observadas por un microscopio simple binocular para analizar la colonización del hongo micorrizador en las raíces por sus características morfológicas y la identificación de las micorrizas (Agerer, 1991). Se buscaron engrosamientos en los ápices del sistema radicular, haciendo especial hincapié sobre los que se encontraban cerca del cuello de la raíz.

3.3 Metodología de inserción de la planta

Los materiales que se han utilizado para la inserción de las plantas en los tarros de vidrio son los siguientes:

- Bisturís.
- Mechero Bunsen.
- Pinzas.
- Papel secante de 10x25 mm aproximadamente.
- Placas de Petri.
- Tarro de cristal con agua destilada.
- Tarro de cristal con alcohol 96°.
- Tarros de vidrio de 0,5 l con 5 plantas puestas a enraizar del clon 8.
- Tarros de vidrio de 0,5 l con 5 plantas puestas a enraizar del clon 10.
- Tarros de vidrio con 75 ml del medio MMN esterilizados.



Figura 10. Disposición del material vegetal en el papel secante a la hora de insertarlo en los tarros de vidrio.

De 1 a 3 plantas fueron colocadas en la hoja de papel secante (**Fig. 10**), dependiendo de su tamaño, y con el bisturí, cuando fue necesario, se acortaron las raíces más largas con el fin de que todas tengan un sistema radicular similar (**Fig. 11**). Luego se acomodaron cada una de ellas en el medio de cultivo de forma que las raíces quedaran bien arropadas y la planta recta. Con las pinzas, se intentó apelmazar levemente el medio.



Figura 11. Ejemplo de sistema radicular con mayor longitud que la media de material vegetal empleado.

Debido a que el micelio inoculado necesita oscuridad para su incubación y crecimiento, se envolvió solo la zona provista de medio MMN con papel de aluminio (**Fig. 12**). Una vez todas las plantas estaban colocadas en los tarros, fueron llevadas a la cámara de cultivo *in vitro* para su crecimiento a 24 °C con un fotoperiodo de 16 horas.



Figura 12. Detalle de seis unidades experimentales donde se puede observar la presencia del papel de aluminio envolviendo el sistema radical de las plantas.

3.4 Diseño experimental

El experimento está conformado por los siguientes tres tipos de tratamientos: (1) inoculación del micelio en el sustrato un mes antes de la inserción de la planta, (2) inoculación del micelio a la vez que la inserción de la planta y (3) control sin inoculación. Cada tipo de inoculación fue testado en dos clones de *P. tremula* (clon 8 y clon 10) diferentes. En cada tipo de inoculación se han testado 30 plantas de cada clon (60 por cada tratamiento). En total se estudiaron 180 plantas.

Tabla 3. Resumen del diseño experimental.

Tratamientos	Tipo inoculación	Clones
1	Micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta	8
		10
2	Micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta	8
		10
3	Control	8
		10

Dentro de la cámara de cultivo *in vitro*, se dispusieron los tarros siguiendo un diseño experimental en 5 cuadrados latinos (**Tablas 3 y 4**). Cada tarro contiene una planta y se considera la unidad experimental. Cada cuadrado latino está dividido en 6 filas y 6 columnas, siendo un total de 36 plantas por cuadrado latino, la mitad de cada clon dispuestos alternadamente.

Tabla 4. Esquema del diseño en cuadrado latino utilizado en este estudio. Tratamiento 1 (verde): micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2 (violeta): micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3 (rojo): control.

		Pared											
Pared		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
		3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
		2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
		Pasillo											
		Pared											
Pared		1	2	3									
		3	1	2									
		2	3	1									
		Pasillo											

3.5 Mediciones

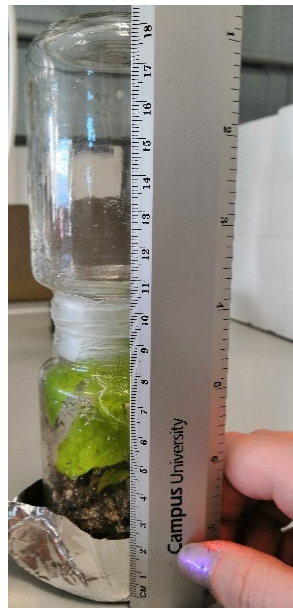


Figura 13. Ejemplo de medición de altura en una unidad experimental.

Desde el momento de inoculación de las plantas se han realizado mediciones de altura de la misma (**Fig. 13**), número de hojas y estado de vigor de la planta (**Tabla 5**) una vez al mes durante tres meses para conocer su evolución en el tiempo.

Tabla 5. Descripción de las variables medidas durante los tres meses de crecimiento.

Variable	Niveles	Descripción
Altura de la planta	-	Diferencia de altura en centímetros entre el ápice del tallo y la base de este mismo.
Número de hojas	-	Número de hojas verdes presentes en el tallo de la planta.
Estado de vigor	1	Tallo recto y color de la planta verdoso.
	2	Tallo levemente inclinado y color amarillento en ciertas zonas de la planta.
	3	Tallo inclinado, con presencia de hojas marchitas y color amarillento/rojizo en varias zonas de la planta o planta enteramente marchita.

**Figura 14.** Proceso de eliminación del sustrato del material vegetal (izq.) y disposición de este mismo sobre una placa de Petri para la medición de las variables estudiadas (der.).

Tras el tercer mes de crecimiento, las plantas fueron extraídas de los tarros para ser limpiadas y finalmente medidas (**Fig. 14**). En este caso se tomaron datos de las siguientes variables (**Tabla 6**): longitud del tallo, número de hojas, longitud de la raíz más larga, presencia de micorrizas (**Fig. 15**), color y biomasa aérea y radical (**Fig. 16**).

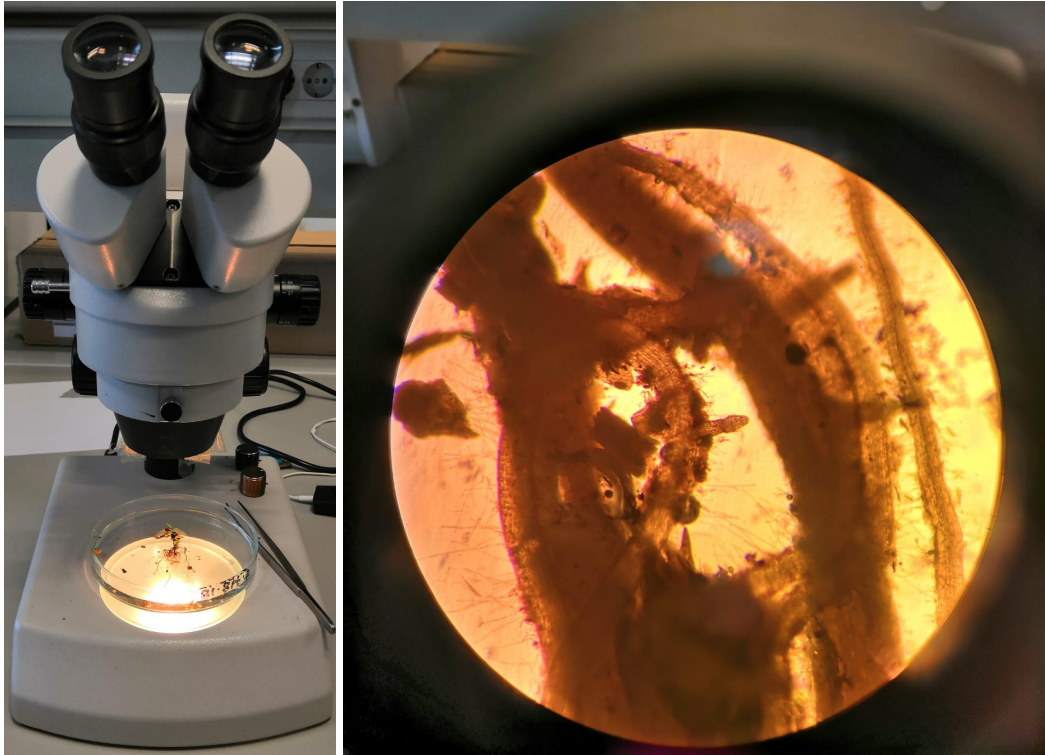


Figura 15. Lupa binocular utilizada para el análisis de presencia de micorrizas (izq.) y detalle de los ápices de las raíces secundarias no micorrizadas (der.).

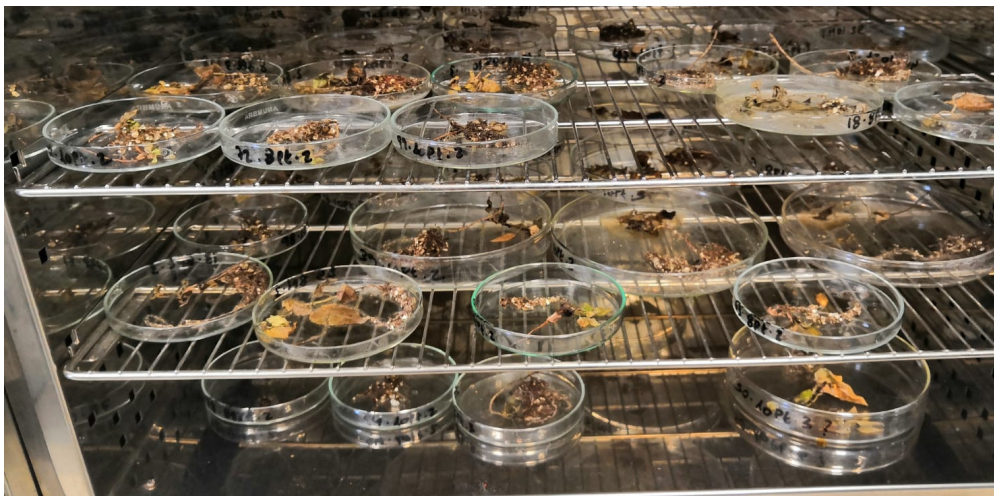


Figura 16. Material vegetal en estado anhidrido tras estar 24 horas en una cámara de secado a 50°C.

Tabla 6. Descripción de las variables medidas al finalizar el experimento.

Variable	Niveles	Descripción
Longitud del tallo	-	Extensión total del tallo estirado en centímetros.
Número de hojas	-	Número de hojas verdes presentes en el tallo de la planta.
Longitud de la raíz más larga	-	Extensión total de la raíz más larga estirada en centímetros.
Biomasa aérea	-	Peso seco en gramos de la parte aérea de la planta pesado en una balanza de precisión tras un periodo 24 horas en una cámara de secado a 50°C.
Biomasa radical	-	Peso seco en gramos de la parte radical de la planta pesado en una balanza de precisión tras un periodo 24 horas en una cámara de secado a 50°C.
Micorrizas	Si	Presencia de engrosamientos en los ápices de algunas raíces.
	No	Sistema radical normal.
Color	Verde	Normalidad.
	Amarillento	Presencia de tonos amarillentos en la parte aérea de la planta.
	Rojizo	Presencia de motas rojizas tanto en el tallo como en el ápice de las hojas.

3.6 Análisis estadístico

El estudio estadístico de las variables medidas, mediante ANOVA mixto de mediciones repetidas, ANOVA mixto multifactorial y modelo logístico, han sido realizados empleando el programa estadístico SAS 9.4. Se ha llevado a cabo también un análisis de residuales y se ha comprobado la normalidad de estos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (Anejo I).

Debido a que diferentes variables estudiadas en el presente trabajo están medidas varias veces en el tiempo (altura de la planta y número de hojas verdes), factor intra-sujetos (T), se ha elegido un análisis de varianza mixto de mediciones repetidas, permitiendo eliminar la variación residual debida a las diferencias entre los sujetos y otorgando a cada variable una varianza específica por ser mixto. Los factores tenidos en cuenta son: tratamiento de inoculación (I) con tres niveles (control, inoculación de micelio incubado durante un mes e inoculación de micelio a la vez que la inserción de la planta); y clon (C) con dos niveles (8 y 10), ambos inter-sujetos.

$$y_{ijk,t} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_t + (\alpha\beta)_{ij} + (\gamma\alpha)_{it} + (\gamma\beta)_{jt} + (\gamma\alpha\beta)_{ijt} + \varepsilon_{ijk,t}$$

Dónde:

- $y_{ijk,t}$ = valor de una variable estudiada hasta el mes t del árbol k, del tipo de tratamiento i y del clon j ($i = 1, 2, 3$; $j = 8, 10$; $t = 0, 1, 2, 3$; $k = k(i, j) = 1, 2, \dots, n_{ij}$).
- μ = Efecto de media general.
- α_i = Efecto del tratamiento i del factor I.
- β_j = Efecto del clon j del factor C.
- γ_t = Efecto del tiempo t del factor T.

- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el nivel i del factor I y el nivel j del factor C.
- $(\gamma\alpha)_{it}$ = Efecto de la interacción entre el nivel i del factor I en el nivel t del factor T.
- $(\gamma\beta)_{jt}$ = Efecto de la interacción entre el nivel j del factor C en el nivel t del factor T.
- $(\gamma\alpha\beta)_{ijt}$ = Efecto de la interacción triple entre el nivel i del factor I, el nivel j del factor C y el nivel t del factor T.
- $\varepsilon_{ijk;t}$ = Error aleatorio en el tiempo t del árbol k del tratamiento i y del clon j .

Se supone, además, que:

- $\varepsilon_{ijk;t} \sim N(0, \sigma_{ijt}^2)$, siendo σ_{ijt}^2 = varianza aleatoria de los errores en el mes t de los árboles del tratamiento i del clon j .
- $\text{Cov}(\varepsilon_{ijk;t}, \varepsilon_{ijk;t'}) = (\tau_{ij})_{tt'} \forall i, j, k, t, t'$ con $t \neq t'$.
- $\text{Cov}(\varepsilon_{ijk;t}, \varepsilon_{i'jk;t'}) = 0$ si $i \neq i'$, o $j \neq j'$, o $k \neq k'$,

Para los datos recogidos en la medición final (longitud del tallo, número de hojas, longitud de la raíz más larga, biomasa aérea y biomasa radical), se ha realizado un análisis ANOVA mixto multifactorial con los siguientes factores: tratamiento (A) y clon (B).

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

- y_{ijk} = valor de una variable estudiada del árbol k, del tipo de tratamiento i y del clon j ($i = 1, 2, 3$; $j = 8, 10$; $t = 1, 2, 3$; $k = k(i, j) = 1, 2, \dots, n_{ij}$).
- μ = Efecto de la media general.
- α_i = Efecto del factor A en el nivel i.
- β_j = Efecto del factor B en el nivel j.
- $(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del factor A en el nivel i con el factor B en el nivel j.
- ε_{ijk} = Error aleatorio del árbol k del tratamiento i y del clon j. Se ha supuesto que $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma_{ij}^2)$ siendo σ_{ij}^2 = varianza aleatoria entre árboles para el tratamiento i en el clon j.

En el caso del estado de vigor de la planta (1, 2 y 3 siendo el primero el mejor) y su variación a lo largo de los tres meses de crecimiento, se ha escogido un modelo logístico para conocer la probabilidad acumulada de pertenecer una planta al estado 1 y al estado 3 para cada uno de los tratamientos y clones puesto de que se trata de una variable entera y no continua.

Para finalizar, se ha realizado una tabulación cruzada entre el atributo fila (color) y el atributo columna (tratamiento o clon), obteniendo así una tabla de contingencia para ambos atributos con la frecuencia observada en cada una de las celdas, el porcentaje por columnas y el total general. Esta tabla refleja la relación de los atributos tenidos en cuenta con los colores observados.

4 RESULTADOS

4.1 Detección de las micorrizas

Tras examinar las raíces de todas las plantas bajo lupa binocular, no se han detectado engrosamientos de los ápices que indiquen la presencia de micorrizas.

4.2 Crecimiento en altura

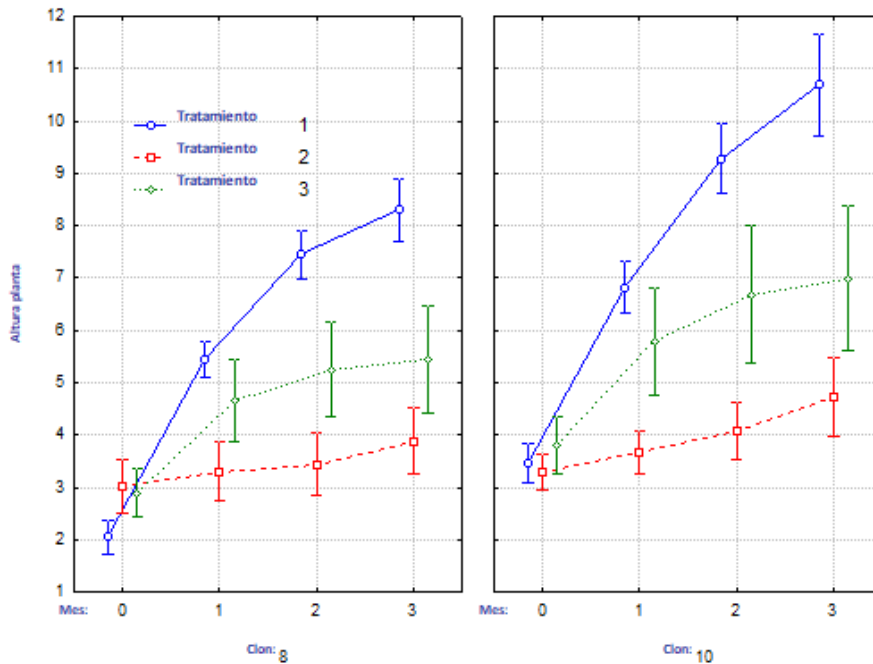


Figura 17. Evolución temporal de la altura de la planta (cm) por tratamiento y clon. Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

En primer lugar, se ha comprobado el grado de significación de cada uno de los tres factores que se han tenido en cuenta para el presente análisis de la varianza, así como sus interacciones dobles y la triple (**Tabla 7**). La única interacción que no es significativa es la que tiene en cuenta tanto el mes, el tratamiento y el clon, facilitando así la exposición de los resultados. Además, la interacción entre el factor tratamiento y el clon muestra un P-valor muy cercano al 0,05, aunque es significativa, está casi al límite de no considerarse así.

También se ha verificado la utilización del modelo de análisis de varianza mixto con el ratio de verosimilitud del modelo nulo, el cual al tener un P-valor menor a 0,05 se corrobora su uso.

Tabla 7. Comprobación de la significación por tratamiento, clon y mes a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable crecimiento en altura (cm).

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	75.86	<u><0,0001</u>
Clon	1	127	20.68	<u><0,0001</u>
Tratamiento*Clon	2	127	3.13	<u>0,0466</u>
Mes	3	453	204,97	<u><0,0001</u>
Mes*Tratamiento	6	453	92,28	<u><0,0001</u>
Mes*Clon	3	453	3,09	<u>0,0270</u>
Mes*Tratamiento*Clon	6	453	0,20	0,9765
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	987,39	<0,0001

En la **figura 17** es posible visualizar que la situación inicial (mes 0) para cada tratamiento y clon muestra diferencias debido a la alta variabilidad en la altura del material vegetal dispuesto. Esto puede suponer una desventaja pues los resultados tienen una menor fiabilidad. Sin embargo, con el paso del tiempo se ha ido estabilizando este defecto inicial. La diferencia es más acusada en el clon 8 y, sobre todo, si se compara la situación inicial del tratamiento 1 con el resto de ellos, pues se observa que su media es mucho menor que el resto.

Como se ha comentado anteriormente, en los primeros meses hay menor diferencia entre tratamientos, aunque si se puede apreciar la tendencia de cada uno de ellos dependiendo del clon analizado:

- El tratamiento 1 (inoculación de micelio incubado durante un mes) es el que presenta mayor media de forma significativa y una curva de crecimiento con una pendiente superior al resto, sobre todo en los dos primeros meses.
- El tratamiento 2 (inoculación de micelio a la vez que la inserción de la planta) es el que ha protagonizado un menor crecimiento en el tiempo, por ejemplo, en la altura media entre el primer y último mes (para el clon 8) existe una diferencia de apenas 1 cm de altura.
- El tratamiento 3 (control) es el que muestra una situación intermedia entre los anteriores, aunque tiene mucha variabilidad entre sus datos, hace que su intervalo de confianza sea bastante amplio.

El clon 10 es el que, con diferencia, ha obtenido medias más elevadas a diferencia del clon 8 en casi todos los meses estudiados.

Centrándonos en el último mes (3), donde las diferencias son más patentes, se han recogido en la **tabla 8** las medias de cada tratamiento y clon, así como cuales de ellas son significativamente diferentes. En este caso, todas lo son.

Tabla 8. Resumen de las medias por mínimos cuadrados por tratamiento y clon al mes 3 de la variable evolución del crecimiento en altura (cm) a un nivel de significación del 5%. Medias sin ninguna letra en común son significativamente distintas. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Factor	Media
Tratamiento	
1	9,50 A
2	4,31 C
3	6,24 B
Clon	
8	5,99 b
10	7,53 a

Estos resultados son complementados y contrastados con los obtenidos en la medición final donde se ha tenido en cuenta la longitud real del tallo, no su altura.

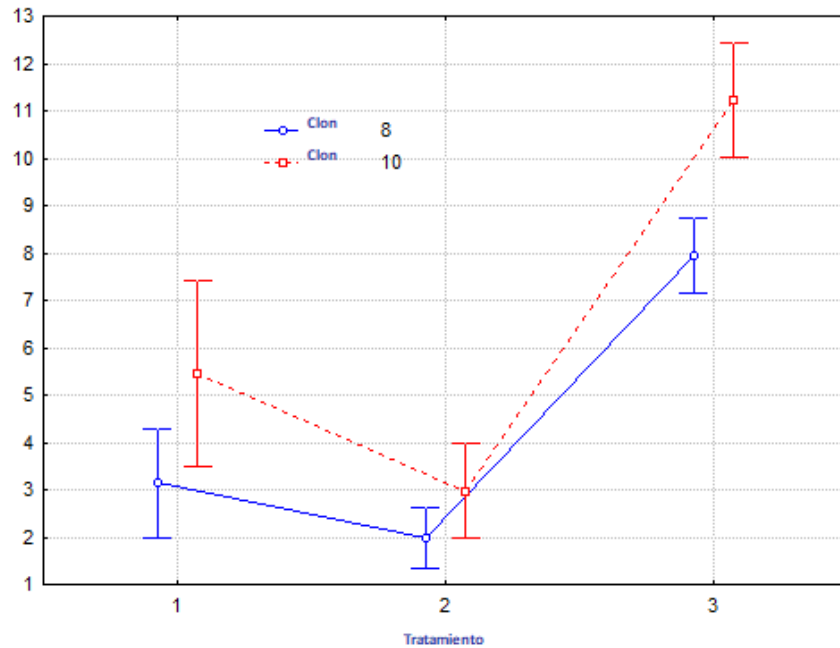


Figura 18. Comparación de las medias obtenidas por tratamiento y clon para la variable longitud de la planta (cm). Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

En la **tabla 9** se encuentran los P-valores de los factores tenidos en cuenta para el análisis de la varianza, así como para la interacción entre ambos. Se puede observar que el factor tratamiento y el factor clon afectan significativamente a la variable longitud de la planta. Sin embargo, la interacción entre ambos en términos generales, no lo es. Por último, el test del ratio de verosimilitud del modelo nulo al tener un valor menor que 0,05 nos dice que la hipótesis de partida (modelo ANOVA mixto) es aceptada.

Tabla 9. Comprobación de la significación por tratamiento y clon a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable longitud de la planta (cm).

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	113,68	<0,0001
Clon	1	127	19,54	<0,0001
Tratamiento*Clon	2	127	3,04	0,0515
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	15,98	<u>0,0069</u>

Como se puede comprobar en la **tabla 10** y en la **figura 18** la media del tratamiento 3 (control) es significativamente mayor que para el resto de tratamientos, seguidamente se encontraría la del tratamiento 1 (inoculación de micelio incubado durante un mes) y en último lugar la media del tratamiento 2 (inoculación de micelio a la vez que la inserción de la planta). En el caso de los clones utilizados en este estudio, es el clon 10 el que presenta una media significativamente mayor que el clon 8.

Tabla 10. Resumen de las medias por mínimos cuadrados por tratamiento y clon al mes 3 de la variable longitud de la planta a un nivel de significación del 5%. Medias sin ninguna letra en común son significativamente distintas. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Tratamiento/Clon	8	10	Promedio
1	3,14 Bb	5,45 Ba	4,26 B
2	2,00 Ba	2,97 Ca	2,50 C
3	7,94 Ab	11,23 Aa	9,52 A
Promedio	4,65 b	6,63 a	

En el caso del crecimiento en altura de la planta, es el tratamiento 1 el que presenta mejores medias a lo largo del tiempo, luego el control y por último el tratamiento 2. En el caso de la longitud de la planta, es el tratamiento 3 el que supera al tratamiento 1 y el tratamiento 2 es el que peor media muestra. El clon 10 tiene una media superior al clon 8 en la gran mayoría de casos.

4.3 Evolución del número de hojas

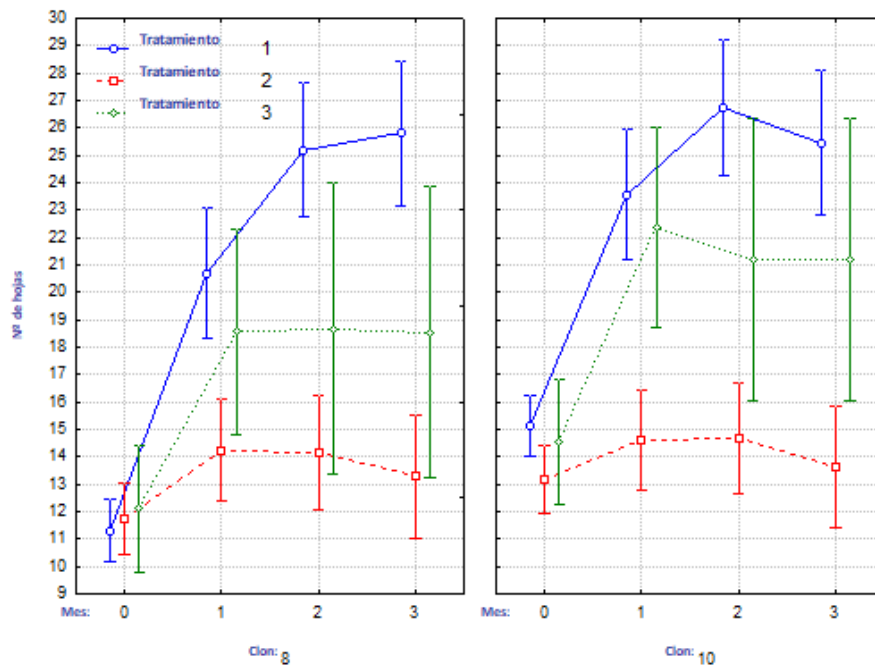


Figura 19. Evolución temporal del número de hojas por tratamiento y clon. Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Para las variables sobre el número de hojas se ha obtenido una mayor variabilidad entre las medias que en el caso anterior, ello puede ser debido a que los datos son números enteros.

En la **tabla 11** se refleja que solo el factor mes y la interacción entre los factores tratamiento y clon afectan significativamente al número de hojas de cada planta analizada (de forma general). No se va a observar diferencia alguna entre clones (**Tabla 12**). El modelo de análisis utilizado también es aceptado en este caso (P -valor $< 0,05$).

Tabla 11. Comprobación de la significación por tratamiento y clon a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable evolución del número de hojas.

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	2,88	0,0917
Clon	1	127	0,45	0,6370
Tratamiento*Clon	2	127	82,19	<0,0001
Mes	3	453	25,83	<0,0001
Mes*Tratamiento	6	453	0,70	0,5508
Mes*Clon	3	453	0,76	0,5992
Mes*Tratamiento*Clon	6	453	2,88	0,0917
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	705,58	<0,0001

En este caso, la variabilidad inicial no es tan destacable como en la altura de la planta y es en el clon 10 donde se muestran mayores diferencias inicialmente.

Es el mes 3 donde se presentan mayores variaciones entre las medias (**Fig. 19 y tabla 12**) teniendo el tratamiento 1 la mayor, le sigue el tratamiento 3 y, por último, el 2. Sin embargo, en los primeros meses no es posible diferenciar el tratamiento 1 con el 3, ni el 2 con el 3.

Tabla 12. Resumen de las medias por mínimos cuadrados por tratamiento y clon al mes 3 de la variable evolución del número de hojas a un nivel de significación del 5%. Medias sin ninguna letra en común son significativamente distintas. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Factor	Media
Tratamiento	
1	25,63 A
2	13,47 C
3	19,90 B
Clon	
8	19,45 a
10	19,96 a

Como en la variable anterior, también se han comparado estos resultados con los obtenidos tras el último mes de crecimiento.

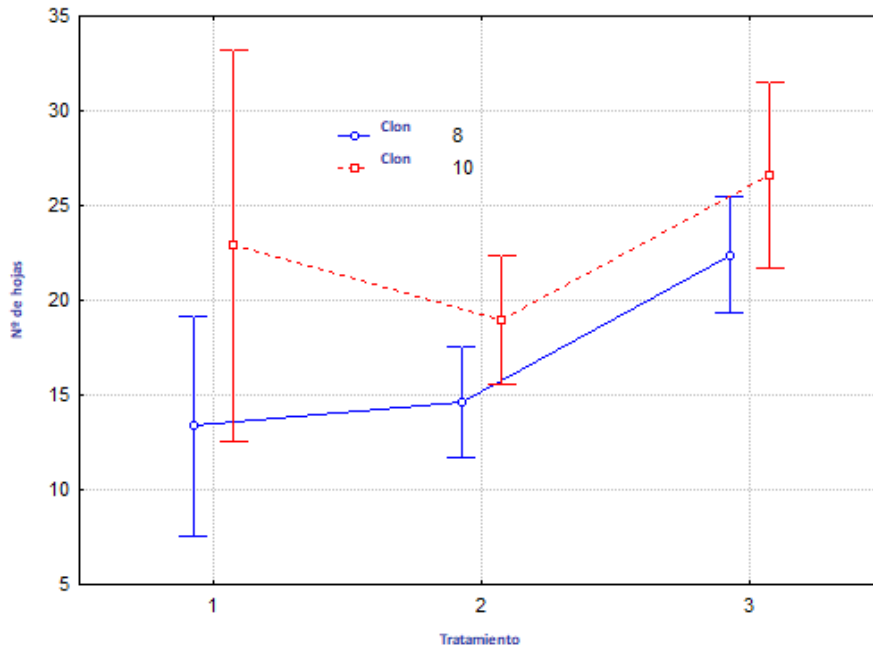


Figura 20. Comparación de las medias de la variable número de hojas final por tratamiento y clon. Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Se puede comprobar que entre las medias de los tratamientos 1 y 2, así como entre los tratamientos 1 y 3 (**Fig. 20** y **tabla 14**) no existen diferencias significativas para la variable número de hojas, en cambio, si las habría entre los tratamientos 2 y 3, este último tiene un mayor número de hojas. La varianza para el clon 10 con el tratamiento 1 es muy elevada.

Tal y como se ha expuesto en la variable anterior, tampoco existe una interacción entre ambos factores (**Tabla 13**).

Tabla 13. Comprobación de la significación por tratamiento y clon a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable evolución del número de hojas final.

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	8,79	<u>0,0003</u>
Clon	1	127	6,66	<u>0,0110</u>
Tratamiento*Clon	2	127	0,35	0,7081
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	25,95	<u><0,0001</u>

Es interesante comentar que la diferencia entre tratamientos, teniendo en cuenta el clon que se está utilizando, da como resultado que los tratamientos 1 y 2 son similares, sin embargo, si se realiza el promedio de los clones para cada tratamiento es cuando el tratamiento 1 no muestra diferencias con el resto (**Tabla 14**).

Tabla 14. Resumen de las medias por mínimos cuadrados por tratamiento y clon al mes 3 de la variable número de hojas final a un nivel de significación del 5%. Medias sin ninguna letra en común son significativamente distintas. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Tratamiento/Clon	8	10	Promedio
1	13,40 Ba	22,93 Ba	18,00 AB
2	14,60 Bb	19,00 Ba	16,88 B
3	22,37 Aa	26,60 Aa	24,40 A
Promedio	17,46 b	22,71 a	

En el caso de la evolución de las hojas en los tres meses de crecimiento es patente que el tratamiento 1 es superior al 3 y ambos muestran medias superiores al tratamiento 2. En cambio, para el número de hojas final tras los tres meses de crecimiento solo el tratamiento 3 es superior al tratamiento 2, puesto que el tratamiento 1 no muestra diferencias significativas con ninguno de ellos.

4.4 Variable longitud de la raíz más larga

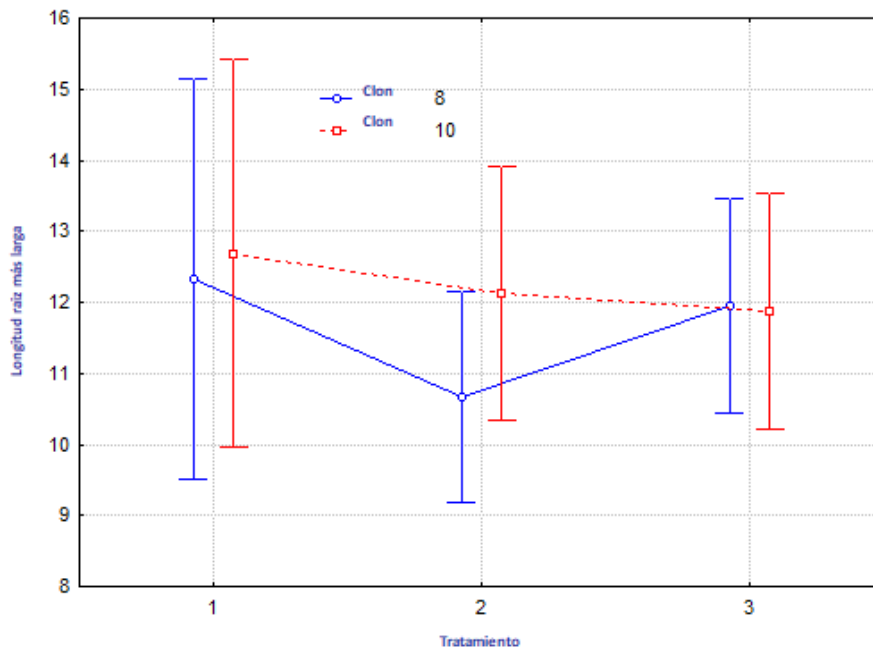


Figura 21. Comparación de las medias de la variable longitud de la raíz más larga (cm) por tratamiento y clon. Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Para la variable longitud de la raíz más larga no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos ni clones, por lo que no arroja ninguna utilidad a la hora de escoger entre los factores (**Fig. 21** y **tabla 15**).

Tabla 15. Comprobación de la significación por tratamiento y clon a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable longitud de la raíz más larga (cm).

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	0,52	0,5972
Clon	1	127	0,47	0,4958
Tratamiento*Clon	2	127	0,47	0,6271
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	4,34	0,5010

4.5 Variable biomasa aérea

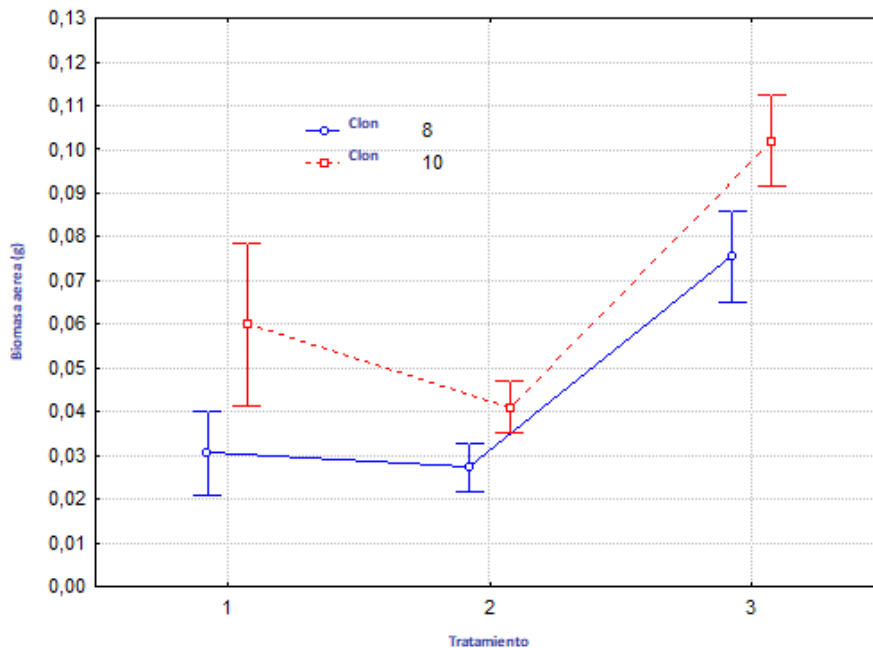


Figura 22. Comparación de las medias de la variable biomasa aérea (g) por tratamiento y clon. Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Al igual que en las anteriores variables, la biomasa aérea no muestra interacción alguna entre ambos factores (**Tabla 16**).

Tabla 16. Comprobación de la significación por tratamiento y clon a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable biomasa aérea (g).

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	81,61	<0,0001
Clon	1	127	26,14	<0,0001
Tratamiento*Clon	2	127	1,74	0,1789
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	24,90	<u>0,0001</u>

Las diferencias entre clones son significativas (**Tabla 17**), es el clon 10 el que tiene una media mayor que el 8. Así mismo, el tratamiento 3 también presenta una media mucho superior que los tratamientos 1 y 2, entre los que no hay diferencias significativas (**Fig. 22** y **tabla 17**). Es mencionable que en el tratamiento 2 se muestra

una varianza mucho menor, siendo igual para ambos clones utilizados aproximadamente.

Tabla 17. Resumen de las medias por mínimos cuadrados por tratamiento y clon al mes 3 de la variable biomasa aérea (g) a un nivel de significación del 5%. Medias sin ninguna letra en común son significativamente distintas. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Tratamiento/Clon	8	10	Promedio
1	0,31 Bb	0,06 Ba	0,04 B
2	0,03 Bb	0,04 Ba	0,03 B
3	0,08 Ab	0,10 Aa	0,09 A
Promedio	0,05 b	0,07 a	

4.6 Variable biomasa radical

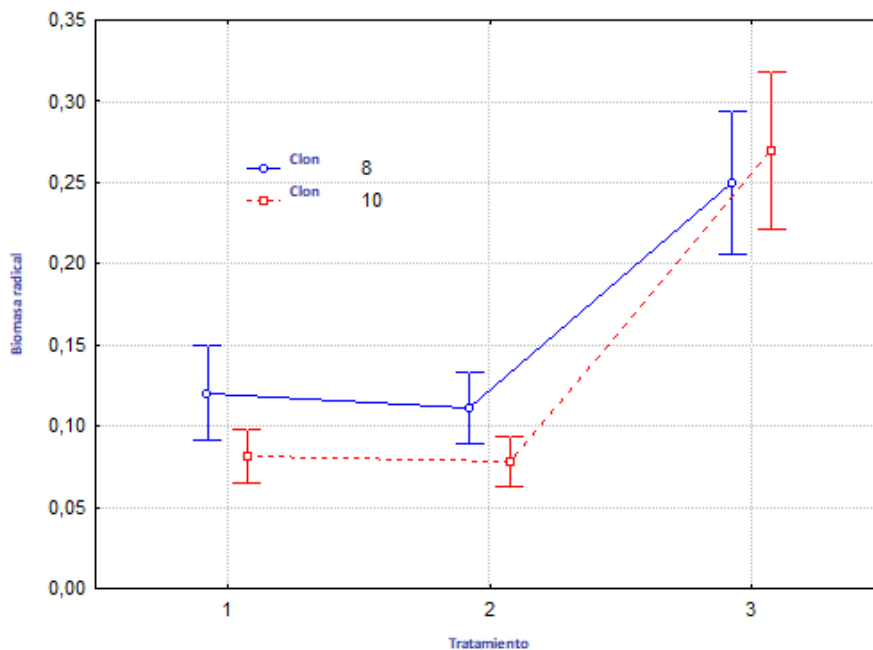


Figura 23. Comparación de las medias de la variable biomasa radical (g) por tratamiento y clon. Intervalos de confianza de las medias al 95% de confianza. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Finalmente, para la variable biomasa radical se puede comprobar en la **tabla 18** que solo el factor tratamiento afecta significativamente a los resultados obtenidos y, como anteriormente se ha comentado, se acepta la hipótesis del modelo mixto.

Tabla 18. Comprobación de la significación por tratamiento y clon a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable biomasa radical (g).

Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	127	43,80	<0,0001
Clon	1	127	1,72	0,1920
Tratamiento*Clon	2	127	1,29	0,2802
Test del ratio de verosimilitud del modelo nulo		DF	Chi-cuadrado	Pr>ChiSq
		5	57,02	<0,0001

En la **tabla 19** y en el **figura 23** es patente que solo el tratamiento 3 es diferente al resto y con una media muy superior. Sin embargo, si se entra en detalle con las medias para cada clon y tratamiento, es visible la diferencia entre clones en los tratamientos 1 y 2, siendo el clon 8 el que presenta una mayor media.

El tratamiento 3, como se puede ver en la **figura 23**, tiene un intervalo de confianza más amplio que el resto, signo de gran variabilidad entre sus datos.

Tabla 19. Resumen de las medias por mínimos cuadrados por tratamiento y clon al mes 3 de la variable biomasa radical (g) a un nivel de significación del 5%. Medias sin ninguna letra en común son significativamente distintas. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Tratamiento/Clon	8	10	Promedio
1	0,12 Ba	0,08 Bb	0,10 B
2	0,11 Ba	0,08 Bb	0,09 B
3	0,25 Aa	0,27 Aa	0,26 A
Promedio	0,17 a	0,15 a	

4.7 Modelo logístico de la variable estado de vigor

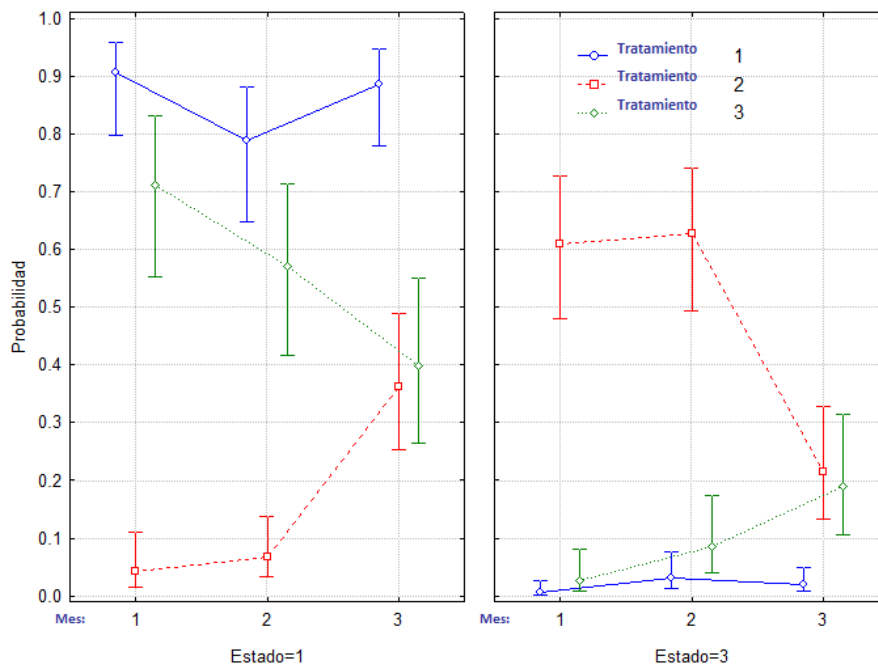


Figura 24. Probabilidad de pertenecer al estado 1 o al estado 3 de vigor, el mejor y el peor respectivamente, para el factor tratamiento.

En la **tabla 20** se observa que solo el factor tratamiento es el que afecta significativamente al estado de vigor de las diferentes plantas analizadas.

Si se observa la **figura 24** detalladamente, el tratamiento 1 es el que presenta una mayor probabilidad, durante los 3 meses del ensayo, de que una planta pertenezca al mejor estado de vigor, el estado 1. A diferencia del tratamiento 2, que solo durante los 2 primeros meses presenta una mayor probabilidad de pertenecer al estado de vigor 3 (el peor) y en el tercer mes mejora notablemente. Las plantas del tratamiento de control comienzan con una alta probabilidad de presentar un buen vigor, pero va disminuyendo con el tiempo. En el último mes no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3.

Tabla 20. Comprobación de la significación por tratamiento, clon y su interacción a un nivel de confianza del 95% y test del ratio de verosimilitud del modelo nulo para la variable estado de vigor.

Efecto	DF	Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Tratamiento	2	31,5152	<0,0001
Clon	1	1,3712	0,2416
Tratamiento*Clon	2	0,0453	0,9776

En términos generales, se podría decir que a lo largo del estudio el tratamiento 1 es el que mejor estado de vigor ha mostrado y se ha mantenido con el tiempo. El tratamiento 2 ha mostrado una mejora paulatina en dicha variable, aunque presente la menor probabilidad de pertenecer al estado 1. Por último, el tratamiento 3 tiene una probabilidad intermedia, pudiéndose ver un empeoramiento del estado a lo largo de los meses.

4.8 Análisis de la variable categórica color

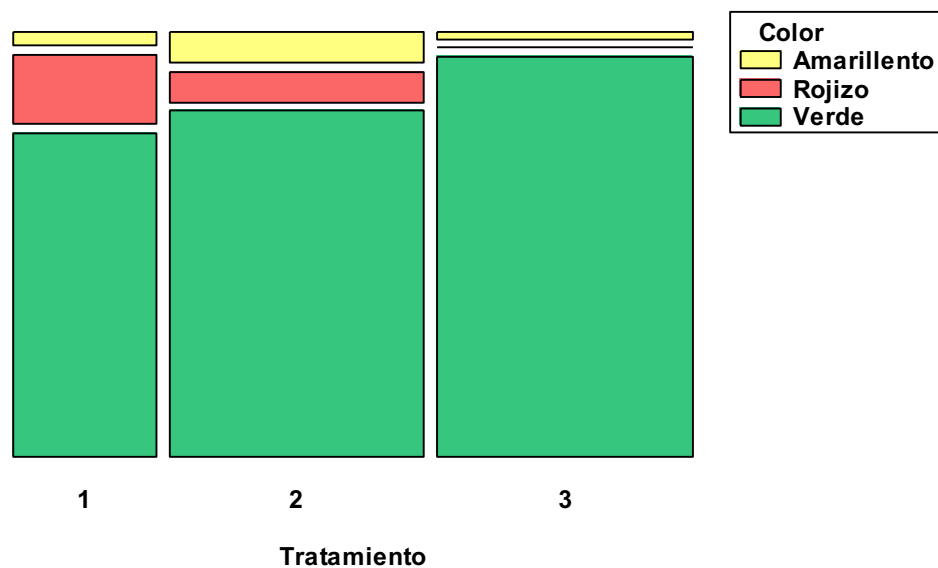


Figura 25. Resultados obtenidos del análisis de ocurrencia entre el factor color y el factor tratamiento. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Los resultados obtenidos en este apartado se han representado en la **figura 25** y en la **tabla 21**. El tratamiento 1, el cual se incubó durante un mes antes de su inoculación, presenta un mayor porcentaje de plantas rojizas que el resto (17,24%). En el tratamiento 2 existe un menor porcentaje de plantas amarillas (7,69 %) que, a su vez, coincide con el de rojizas. Finalmente, en el tratamiento 3, el porcentaje de rojizas es nulo, el de amarillentas es muy bajo (1,92%) y es el que más plantas verdes presenta (98,08% frente a 71,1% del tratamiento 1 y 84,62% del tratamiento 2).

Aunque en la muestra de plantas analizadas existen casos de colores diferentes al verde, es patente que este color predomina sobre el resto (88,72%).

Tabla 21. Tabla de contingencia entre el factor color y el factor tratamiento con un nivel de confianza del 95%. Contenido de las celdas: frecuencia observada, porcentaje de la tabla y porcentaje de la columna. Tratamiento 1: micelio inoculado 1 mes antes de la inserción de la planta, tratamiento 2: micelio inoculado a la vez que la inserción de la planta y tratamiento 3: control.

Color/Tratamiento	1	2	3	Total por Fila
Amarillento	1	4	1	6
	0,75%	3,01%	0,75%	4,51%
	3,45%	7,69%	1,92%	
Rojizo	5	4	0	9
	3,76%	3,01%	0,00%	6,77%
	17,24%	7,69%	0,00%	
Verde	23	44	51	118
	17,29%	33,08%	38,35%	88,72%
	79,31%	84,62%	98,08%	
Total por Columna	29	52	52	133
	21,80%	39,10%	39,10%	100,00%

Por último, en la **tabla 22** se comprueba la independencia de las filas (color) con las columnas (tratamiento), obteniendo un P-valor menor que 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis de independencia y se puede afirmar que hay relación entre el tratamiento empleado con el color observado de la planta al final del experimento. Por el contrario, el P-valor obtenido para comprobar la independencia del clon con el color es mayor que 0,05, por lo que se puede decir que el valor observado de color para un caso en particular pudiera no tener relación con su valor en el clon.

Tabla 22. Prueba de independencia de los factores color y tratamiento a un nivel de confianza del 95%.

Columna	Prueba	Estadístico	Grados de libertad	P-valor
Tratamiento	Chi-Cuadrada	11,199	4	0,0244
Clon	Chi-Cuadrada	1,128	2	0,5689

5 DISCUSIÓN

No se ha encontrado evidencia visual alguna de la presencia de micorrizas en las raíces de las plantas de *Populus tremula* inoculadas con el hongo *Leccinum aurantiacum*. Sin embargo, sí que se han observado diferencias significativas entre los tres tipos de tratamientos de inoculación utilizados sobre *P. tremula* que sugieren la existencia de interacción entre el hongo y la planta.

No se han sintetizado micorrizas en ninguno de los tratamientos de inoculación y en la gran mayoría de variables no hay diferencias entre ellos, lo que significa que el tiempo de incubación no ha jugado un papel relevante en el crecimiento y desarrollo de la planta.

Existen determinados hongos que necesitan varios componentes para obtener una micorriza estable (Lei et al., 2008; Morcillo & Sánchez, 1996). Uno de estos componentes a tener en cuenta es el suelo donde se desarrollan, puesto que la cantidad de materia orgánica y nutrientes presentes en este afecta directamente al porcentaje de micorrización, así como a la longitud del tallo, producción de biomasa, a la captación de nitrógeno (Baum, Schmid, & Makeschin, 2000; Martínez Reyes et al., 2012; Perea Estrada et al., 2009) o al porcentaje de supervivencia (Langer et al., 2008; Navas Gil, 2003). La presencia de vitaminas y micronutrientes en el suelo necesarios para la planta condiciona la síntesis de micorrizas (Langer et al., 2008).

Las interacciones entre los hongos y sus plantas huéspedes son complejas puesto que no son solo estos dos los que intervienen en sus fructificaciones y micorrizas, sino que, por ejemplo, existen varios casos en los que la presencia de bacterias favorece la formación de micorrizas. Varios hongos micorrícicos, como las cantarelas y algunas trufas, siempre van asociados al grupo de bacterias *Pseudomonas* (Morcillo & Sánchez, 1996). Estas bacterias pueden facilitar el acceso a fuentes de alimento para el hongo o ayudar en la supresión de hongos competidores. Por otro lado, también la interacción entre dos hongos, puede favorecer su fructificación, como por ejemplo el *Boletus edulis* que aparece también asociado a *Clitopilus prunulus* y *Amanita excelsa* (Areitio et al., 2006). Es interesante destacar también el hecho de que no todos los hongos encajan a la perfección dentro de las tres categorías: micorrícico, saprófito y parásito, sino que se encuentran en una situación intermedia, haciendo que su interacción sea aún más compleja con la planta hospedante. Estudiar la micorrización sobre las especies elegidas junto con la

presencia de otro organismo y cómo afecta éste puede ser una línea de investigación futura muy interesante.

Otro componente importante a tenido en cuenta es el tiempo de colonización del micelio. Es posible que el nulo porcentaje de micorrización que se ha observado en el presente trabajo sea debido a una expansión insuficiente del micelio del *L. aurantiacum*. Esto ocurre con otros hongos micorrícicos como: *B. edulis*, el cual crece de forma lenta en cultivos puros y tarda alrededor de dos meses en completar la colonización del sustrato (Mediavilla et al., 2014). En especies arbóreas el género *Carpinus*, que tarda alrededor de un año en micorrizar todo el sistema de raíces absorbentes y el género *Quercus*, que es más lento, pudiendo llegar de uno a dos años o solo con partes individuales parcialmente colonizadas de plantas con mayor edad (Frank, 2005). En el caso más específico de hongos micorrícicos del género *Populus* no es hasta después de seis meses de crecimiento cuando son claramente visibles, así como el incremento de la longitud y el diámetro basal de los brotes (Ma et al. 2008). Esta lenta colonización del micelio podría ser paliada invirtiendo un tiempo de crecimiento mayor de mínimo seis meses.

La variación intraespecífica de los hongos ectomicorrícicos también debe tenerse en cuenta puesto que hongos de la misma especie pueden presentar un crecimiento y una tasa de colonización muy diferentes entre sí (Parladé et al., 2011; Pera & Alvarez, 1995). Incluso el uso de varias cepas fúngicas combinadas podría mejorar los efectos de la inoculación (Makeschin et al., 2002). Además, la viabilidad miceliar crece en el momento en el que el hongo es incubado en un ambiente estéril (Chung Guin-po, 2005). Una futura optimización del protocolo de inoculación sería el estudio de varias cepas de *L. aurantiacum* aislados para poder elegir los que son más productivos.

Es destacable la idoneidad de las condiciones del experimento puesto que la planta no se ha encontrado bajo ningún tipo de estrés durante todo el experimento. La formación de micorrizas ayuda tanto al crecimiento como a la supervivencia del individuo cuando sufre estrés tanto biótico con presencia de patógenos o compuestos orgánicos (Jung et al., 2015), como abióticos (estrés hídrico y salino o presencia de metales pesados) (Szuba, 2015). Esta carencia de las condiciones a las que se encuentran las plantas estudiadas es posible que haya afectado al proceso de síntesis de micorrizas, por lo que introducir variables de estrés en el crecimiento y desarrollo a éstas facilitaría la micorrización.

A pesar de no haberse observado micorrizas, está claro que se ha producido una interacción entre *L. aurantiacum* y *P. tremula* que es de gran interés. Dado que el hongo está activo cuando se coloca en el mismo tarro que la planta y que el crecimiento y desarrollo de esta se ven afectados. Existe una dependencia recíproca entre el crecimiento de ambos organismos (Frank, 2005), aunque de forma más compleja de lo que esperábamos, puesto que las plantas micorrizadas presentan una biomasa menor que las que no lo están, pero la altura y el vigor de las plantas del tratamiento 1 supera a las del control, mientras que las del tratamiento 2 no.

Estas diferencias pueden ser debidas a que ambas especies compiten por los nutrientes del sustrato (Frank, 2005). Las diferencias significativas encontradas entre los dos tratamientos de inoculación con micelio de *L. aurantiacum* utilizados radica en el tiempo de incubación realizado para uno de ellos. Es posible que la competencia por los nutrientes sea más acusada en las primeras etapas de la colonización. El micelio necesitaría expandirse por el sustrato, requiriendo una mayor captación de nutrientes. Cuando el hongo ha podido desarrollarse previamente sin competencia con la planta (tratamiento 1) estaría en condiciones de establecer una relación de simbiosis que favorece el crecimiento vegetal, mientras que si no ha alcanzado determinada fase de desarrollo, se establecería una competencia por los nutrientes que ralentizaría el crecimiento y disminuiría el vigor de la planta (respecto al control).

Durante el crecimiento de las plantas, se ha visto que el tratamiento que se dejó incubar presenta una media superior al tratamiento no incubado en las variables crecimiento en altura y en la evolución del número de hojas. Esto sugiere que realizar el mismo estudio sobre micelio incubado por un periodo de tiempo mayor (dos a cuatro meses) sería de especial interés con el fin de confirmar si utilizando un periodo de incubación superior mejora la síntesis de micorrizas.

Los resultados obtenidos en estudios anteriores, las plantas micorrizadas presentan mayores crecimientos tanto en la parte aérea de ésta como en la radical que las no micorrizadas. Por ejemplo, las especies *Pinus patula* y *P. hartwegii* micorrizadas con los géneros *Hebeloma* y *Laccaria* muestran diferencias significativas positivas respecto a las plantas no inoculadas y a las que no han conseguido formar ectomicorrizas (género *Clavulina*) (Perea Estrada et al., 2009). En el caso de la especie *P. greggi* micorrizada con *Hebeloma mesophaeum* reporta resultados similares al estudio anterior, exponiendo también que las micorrizas incrementan los contenidos de N, P, K, Ca y Mg de la planta (Martínez Reyes et al., 2012). Esto contrasta con que la inoculación con el micelio de *Leccinum aurantiacum* en el

tratamiento 2 ha afectado de forma negativa y significativa en los primeros estadios de la interacción con *Populus tremula*. Conocer exactamente qué es lo que ha ocurrido y cuál ha sido el factor o factores determinantes para esta diferencia de crecimiento es vital para ampliar los conocimientos, conduciéndonos a la producción de cultivos comerciales de *P. tremula* con *L. aurantiacum*.

En conclusión, conseguir la micorrización y la producción en masa del *Populus tremula* con una especie fúngica comestible es muy interesante por su doble aprovechamiento. A pesar del desconocimiento para su plantación comercial que existe actualmente, existen varios estudios que nos acercan a este futuro prometedor. Las posibles líneas de investigación que harán conseguir este doble aprovechamiento son: el estudio de los ejemplares de *Leccinum aurantiacum* más productivos; las interacciones que tiene esta ectomicorriza tanto con el huésped como con otros organismos que puedan estar presentes en el sustrato; el tiempo de colonización requerido por el micelio; medios de cultivo enriquecidos con nutrientes y vitaminas; y cómo afecta un periodo de incubación mayor al aplicado en este estudio a la síntesis de micorrizas.

6 CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las conclusiones generales de los resultados obtenidos de este estudio:

1. No se ha encontrado presencia de micorrizas en el sistema radicular de las plantas inoculadas con micelio de *Leccinum aurantiacum*, en ninguno de los tratamientos probados.
2. La hipótesis de partida de que un tiempo mayor de incubación del micelio podría mejorar la micorrización no ha sido refrendada por los resultados negativos sobre la presencia visible de micorrizas, pero ha tenido un efecto significativo y positivo sobre el crecimiento en altura de las plantas y su vigor.
3. Cuando el micelio se ha introducido sin incubación previa (tratamiento 2), se ha manifestado una disminución del vigor y la altura de las plantas respecto al control.
4. Se propone para futuras investigaciones una duración del experimento mayor, alrededor de seis meses, para aumentar el tiempo de contacto entre el hongo y la planta con el fin de mejorar la síntesis de micorrizas.
5. También se propone cambiar la duración del tiempo de incubación al que ha sido sometido el micelio de *L. aurantiacum* del tratamiento 1 con el fin de conocer su interacción con la planta en los primeros meses de crecimiento y analizar el más viable.
6. Otra línea de investigación interesante estaría relacionada con la presencia de un suplemento de nutrientes y vitaminas en el medio de cultivo y como afecta estos al crecimiento y desarrollo tanto de la planta como de la especie fúngica.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R. (1991). Characterization of ectomycorrhiza, in: Norris JR, Read DJ, Varma AK. (Eds.), *Techniques for the Study of Mycorrhiza. Academic Press, London*, 25–73.
- Alba, N. (2000). Conservación de recursos genéticos del género *Populus*. 46–57.
- Areitio, E. S., Olariaga, I., & Salcedo, I. (2006). Estudio comparativo de las micocenosis de robledal y pinar en la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (Bizkaia).
- Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez de la O, J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., & Peña-Ortega, M. G. (2008). Propagación *in vitro* del maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo*, 14, 263–269.
- Ayala, N. (2011). Establecimiento *in vitro* de molle (*Schinus molle* L.) a partir de yemas axilares tomadas de plantas madre para la propagación de la especie en el DMQ. 1–152.
- Baum, C., Schmid, K., & Makeschin, F. (2000). Interactive effects of substrates and ectomycorrhizal colonization on growth of a poplar clone. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 221–226.
- Burgess, T., Dell, B., & Malajczuk, N. (1996). *In vitro* synthesis of *Pisolithus-Eucalyptus* ectomycorrhizae: Synchronization of lateral tip emergence and ectomycorrhizal development. *Mycorrhiza*, 6, 189–196.
- Chung Guin-po, P. (2005). Hongos micorrícicos comestibles: opción productiva aplicada a las plantaciones forestales. INFOR.
- Cripps, C. L., & O. K. Miller, J. (1995). Ectomycorrhizae formed *in vitro* by quaking aspen: including *Inocybelacera* and *Amanitapantherina*. 357–370.
- Easton, E. P. (1997). Genétic variation and conservation of the native aspen (*Populus tremula* L.) resource in Scotland. *The University of Edinburgh*. Ph. D. Thesis.
- Especies forestales de España. (2019). Ficha descriptiva de *Populus tremula* [Online]. Disponible en: http://especiesforestales.com/D_Ptremula.html [Consultado a: 15/06/2019].
- Euforgen. (2009). Distribution map of aspen (*Populus tremula*) [Online]. Disponible en: <http://www.euforgen.org/species/populus-tremula/> [Consultado a: 15/06/2019].
- Frank, B. (2005). On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with

- belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza*, 15, 267–275
- Gómez, A., Beatriz, G., López, P., Manuel, J., Corbi, G., Ángeles, M., & Pérez, B. (2014). Micropropagación de *Populus tremula* L., 1–11.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungser. Mat. Nat. K. Kais. Akad. Wiss. (Wien)*, 111: 69–92.
- Honrubia, M., Torres, P., Diaz, G., & Morte, A. (1994). Biotecnología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas.
- Jung, S. C., Martínez Medina, A., López Ruez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-Induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 651–664.
- Langer, I., Krpata, D., Peintner, U., Wenzel, W. W., & Schweiger, P. (2008). Media formulation influences in vitro ectomycorrhizal synthesis on the European aspen *Populus tremula* L. *Mycorrhiza*, 18, 297–307.
- Lei, M., Xiaoqin, W., & Ling, Z. (2008). Mycorrhizal formation of nine ectomycorrhizal fungi on poplar cuttings. *Frontiers of Forestry in China*, 475–479.
- López Almansa, J. C., & Martín García, L. P. (2014). Distribución y caracterización ambiental de *Populus tremula* L. en la provincia de Ávila. 6º Congreso Forestal Español, 1–12.
- Ma, L., Wu, X., & Zheng, L. (2008). Mycorrhizal formation of nine ectomycorrhizal fungi on poplar cuttings. *Frontiers of Forestry in China*, 475–479.
- Makeschin, F., Baum, C., & Stetter, U. (2002). Growth response of *Populus trichocarpa* to inoculation by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in a pot and a field experiment. *Forest Ecology and Management*, 1–8.
- Martínez R; Azpíroz H; Rodríguez J; Cetina V; Gutiérrez M; Sahum J. (2005). Micropropagación clonal in vitro en *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*. *Universidad Autónoma Indígena de México*, 177–200.
- Martínez Reyes, M., Pérez Moreno, J., Villarreal Ruiz, L., Ferrera Cerrato, R., Xoconostle Cázares, B., Vargas Hernández, J. J., & Honrubia García, M. (2012). Crecimiento y contenido nutricional de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrícico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XVIII, 183–192.

- Martínez Zurimendi, P., Sierra de Grado, R., & del Peso Taranco, C. (2003). El álamo temblón. Bases para su cultivo, gestión y conservación. Propagación y cultivo (1ª Edición). Ediciones Mundi-Prensa.
- Marx, D. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59, 153–163.
- Mediavilla, O., Olaizola, J., & Martín Pinto, P. (2014). Effects of the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula on the mycorrhizal synthesis between *C. ladanifer* L. and *B. edulis* Bull. *Mycorrhiza*, 1–24.
- Mediavilla, O., Olaizola, J., Santos-Del-Blanco, L., Oria De Rueda, J. A., & Martín Pinto, P. (2016). Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. *Mycorrhiza*, 26(2), 161–168.
- Morcillo, M., & Sánchez, M. (1996). ¿Por qué es tan difícil cultivar hongos micorrícicos comestibles?
- Morte, M. A., Cano, A., Honrubia, M., & Torres, P. (1994). *In vitro* mycorrhization of micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia claveryi* (desert truffle). *Agricultural and Food Science*, 3, 309–314.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Capítulo 2. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Cultivo de tejidos en la Agricultura*, pp. 20–40.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473–479.
- Navas Gil, G. (2003). Micorrización de planta de *Populus tremula* L. obtenida por estaquilla de raíz, semilla y cultivo *in vitro*, con hongos simbioses ecomicorrícicos. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias. Palencia. Universidad de Valladolid.
- Oria de Rueda, J. A., Martín Pinto, P., & Olaizola, J. (2008). Bolete productivity of cistaceous scrublands in northwestern Spain. *Economic Botany*, 62, 323–330.
- Parladé, J., Hortal, S., Varga, H., & Pera, J. (2011). Intraspecific variability of *Lactarius deliciosus* isolates: colonization ability and survival after cold storage. *Mycorrhiza*, 393–401.
- Pera, J., & Alvarez, I. (1995). Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*. *Mycorrhiza* 5,

193–200.

- Perea Estrada, V. M., Pérez Moreno, J., Ruiz, L. V., Santos, A. T., Lourdes, M. De, Bauer, D. I. De, ... Tijerina, L. (2009). Humedad edáfica , nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento del pino, 93–102.
- Sierra de Grado, R. (2003). El álamo temblón. Bases para su cultivo, gestión y conservación. Introducción (1ª Edición). Grupo Mundi-Prensa.
- Sierra de Grado, R., Martínez Zurimendi, P., & López de Heredia Larrea, U. (2003). El álamo temblón: bases para su cultivo, gestión y conservación. Reproducción sexual y diversidad genética de *Populus tremula*. 1ª edición, 151–167.
- Sierra, J. L., López, T., & Eiroal, J. (2002). Setas cultivadas.
- Szuba, A. (2015). Ectomycorrhiza of *Populus*. *Forest Ecology and Management*, 347, 156–169.
- Toribio, M., & Celestino, C. (1989). Cultivo in vitro del alcornoque. *Scientia Gerundensis*, 15, 11–21.
- Uribe, M., & Cifuentes, L. (2004). Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque*, 25, 129–135.
- Worrell, R., Gordon, A. G., Lee, R. S., & McInroy, A. (1999). Flowering and seed production os aspen in Scotland during a heavy seed year. *Forestry*, 72, nº 1, 27–34.

ANEJOS

ÍNDICE ANEJOS

1. Anejo I: Análisis de residuales	58
1.1 Análisis ANOVA mixto de medidas repetidas.....	58
1.1.1 Crecimiento en altura.....	58
1.1.2 Evolución del número de hojas.....	59
1.2 Análisis ANOVA mixto multifactorial de las variables finales.....	60
1.2.1 Variable longitud del tallo.....	60
1.2.2 Variable número de hojas.....	61
1.2.3 Variable longitud de la raíz más larga	62
1.2.4 Variable biomasa aérea	63
1.2.5 Variable biomasa radical	64

Anejo I: Análisis de residuales

1. Anejo I: Análisis de residuales

1.1 Análisis ANOVA mixto de medidas repetidas

1.1.1 Crecimiento en altura

Tabla 1. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable crecimiento en altura (cm)

N	628	Sumar pesos	628
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00079713	Varianza	1,0015949
Asimetría	0,29541706	Curtosis	-0,1719556
SC no corregida	628	SC corregida	628
Coef. variación	.	Media error std	0,03993615

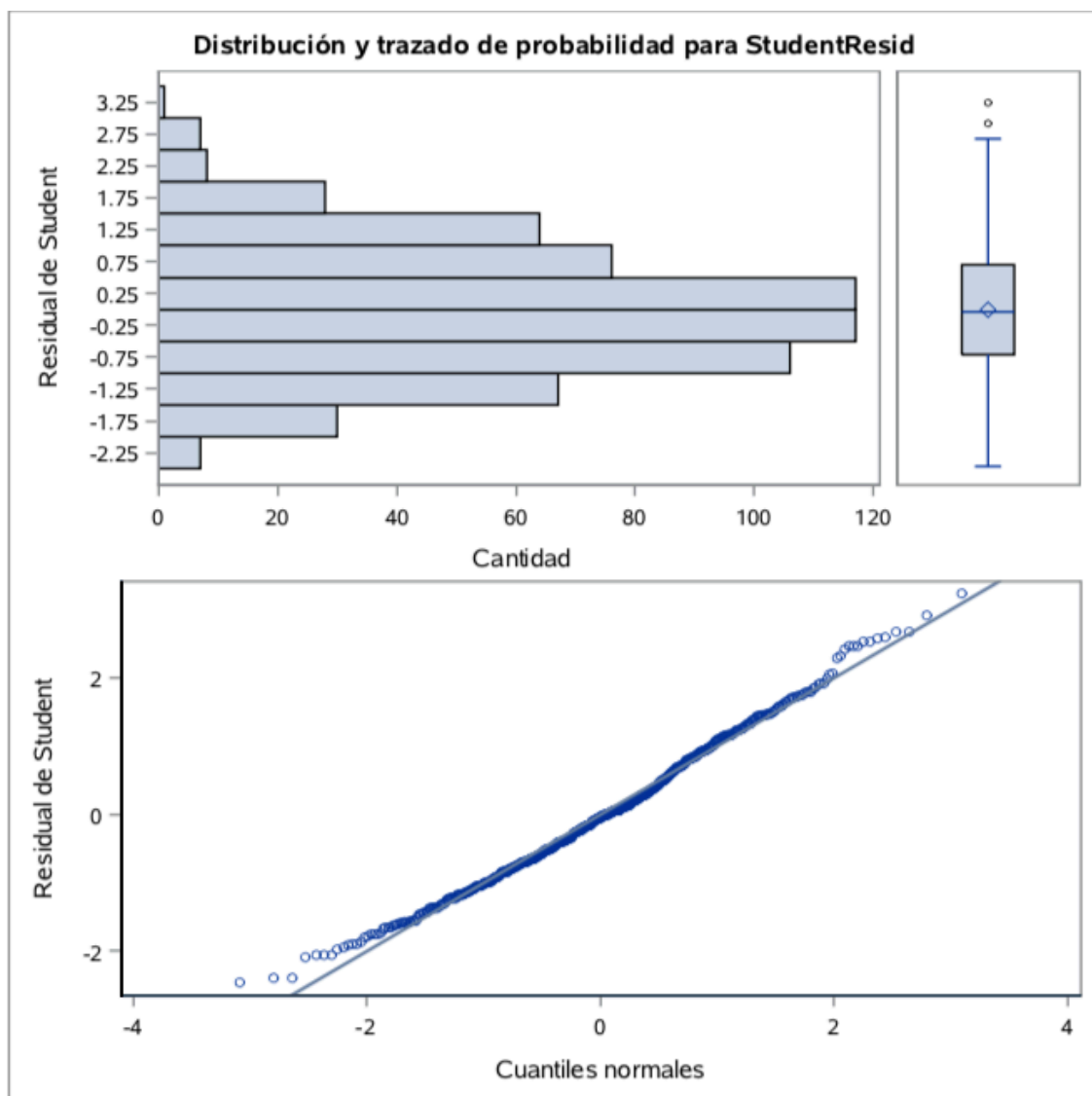
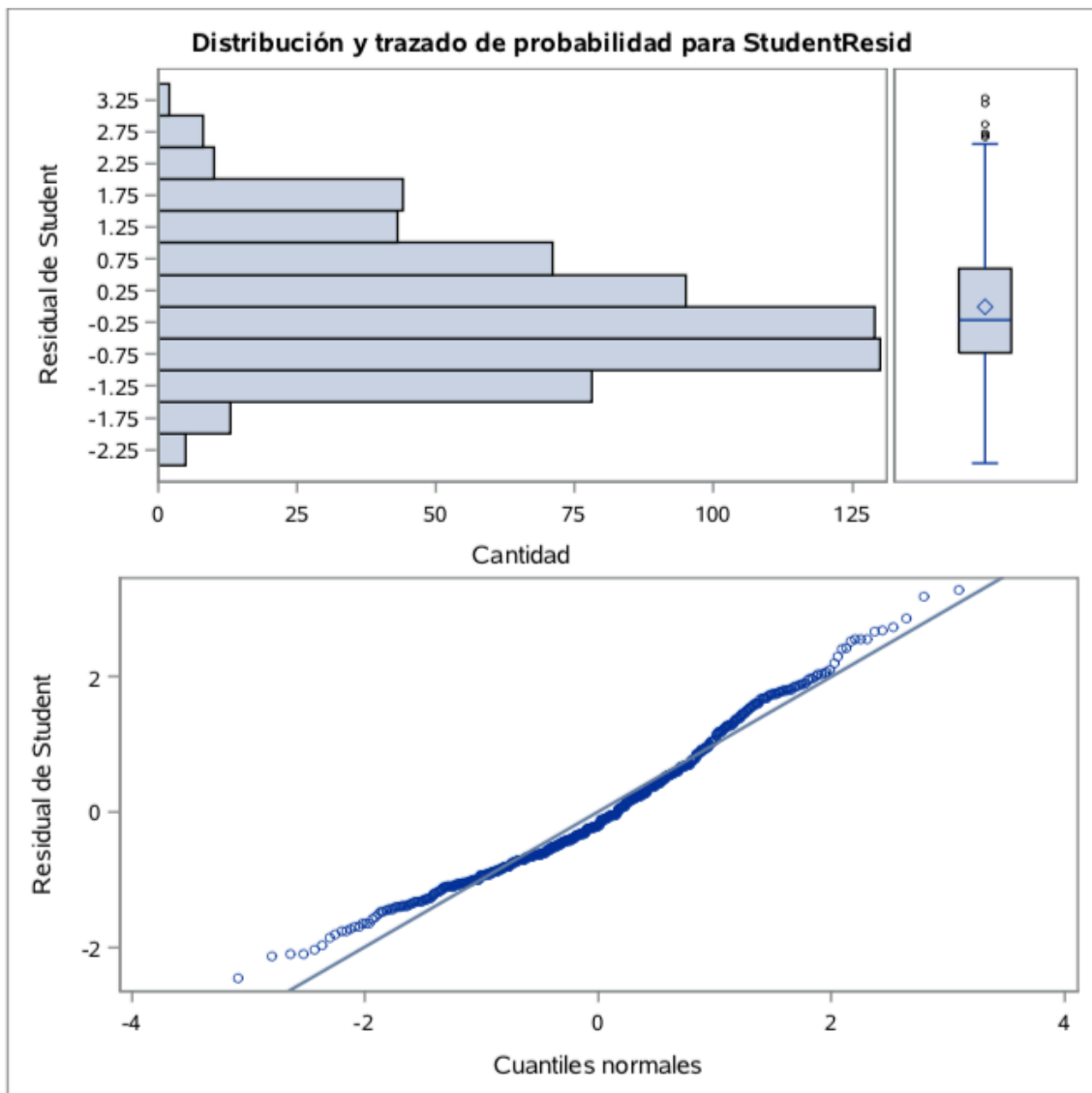


Figura 1. Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable crecimiento en altura (cm).

1.1.2 Evolución del número de hojas

Tabla 2. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable evolución del número de hojas.

N	628	Sumar pesos	628
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00076671	Varianza	1,00153401
Asimetría	0,56349563	Curtosis	-0,064311
SC no corregida	627,961821	SC corregida	627,961821
Coef. variación	.	Media error std	0,03993494

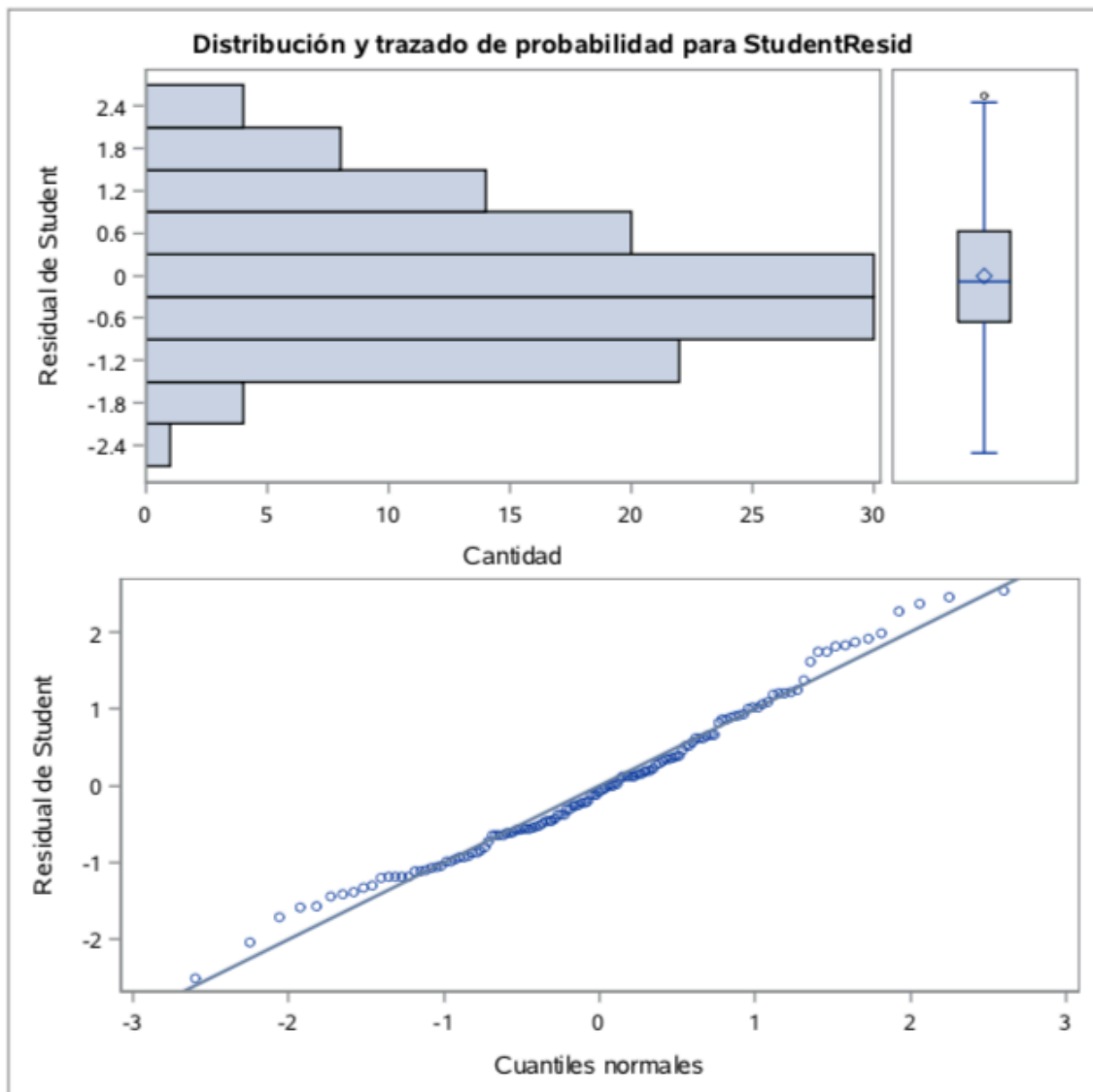
**Figura 2.** Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable evolución del número de hojas.

1.2 Análisis ANOVA mixto multifactorial de las variables finales

1.2.1 Variable longitud del tallo

Tabla 3. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable evolución del longitud del tallo (cm).

N	133	Sumar pesos	133
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00378073	Varianza	1,00757576
Asimetría	0,38617898	Curtosis	-0,1305793
SC no corregida	133	SC corregida	133
Coef. variación	.	Media error std	0,08703883
Saphiro-wilk	0,0911	Kolmogorov-Smirnov	>0,1500
(P valor)		(P valor)	

**Figura 3.** Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable longitud del tallo (cm).

1.2.2 Variable número de hojas

Tabla 4. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable número de hojas.

N	133	Sumar pesos	133
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00378073	Varianza	1,00757576
Asimetría	0,95515764	Curtosis	0,72506765
SC no corregida	133	SC corregida	133
Coef. variación	.	Media error std	0,08703883
Saphiro-wilk	<0,0001	Kolmogorov-Smirnov	<0,0100
(P valor)		(P valor)	

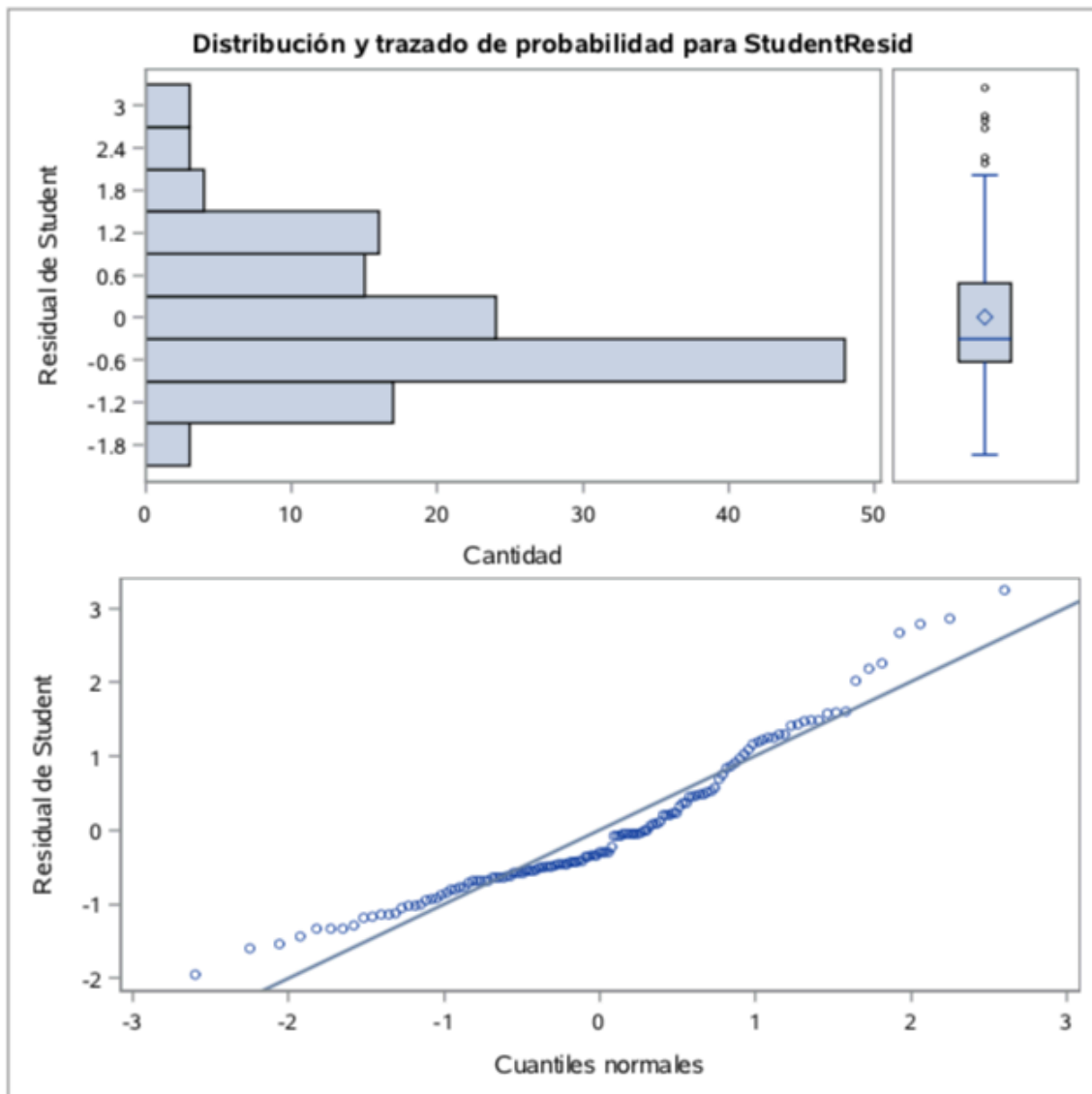
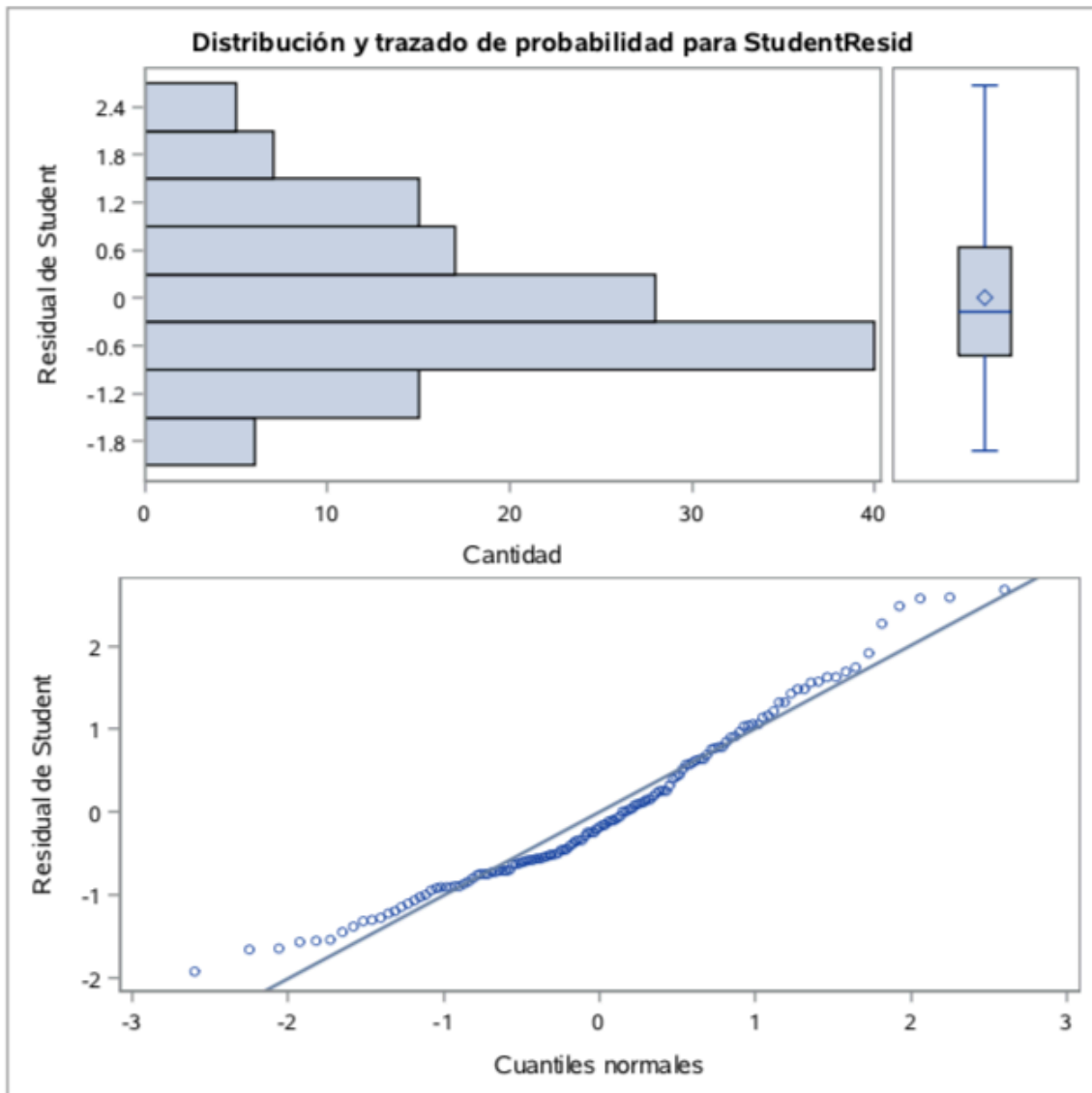


Figura 4. Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable número de hojas.

1.2.3 Variable longitud de la raíz más larga

Tabla 5. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable longitud de la raíz más larga (cm).

N	133	Sumar pesos	133
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00378073	Varianza	1,00757576
Asimetría	0,61496645	Curtosis	-0,1043779
SC no corregida	133	SC corregida	133
Coef. variación	.	Media error std	0,08703883
Saphiro-wilk	0,0913	Kolmogorov-Smirnov	<0,0100
(P valor)		(P valor)	

**Figura 5.** Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable longitud de la raíz más larga(cm).

1.2.4 Variable biomasa aérea

Tabla 6. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable biomasa aérea (g).

N	133	Sumar pesos	133
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00378073	Varianza	1,00757576
Asimetría	0,91345557	Curtosis	1,22394188
SC no corregida	133	SC corregida	133
Coef. variación	.	Media error std	0,08703883
Saphiro-wilk	0,0002	Kolmogorov-Smirnov	<0,0100
(P valor)		(P valor)	

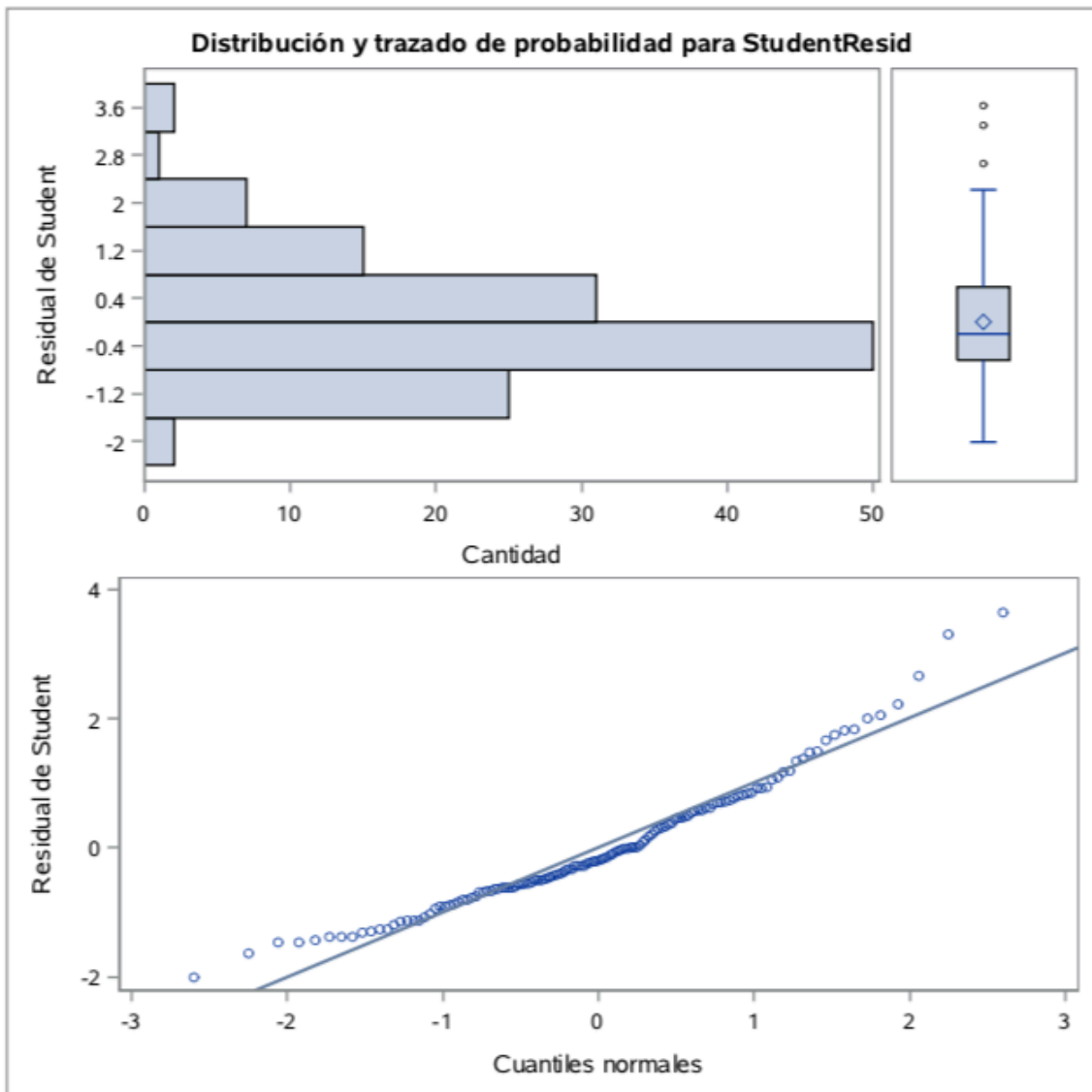
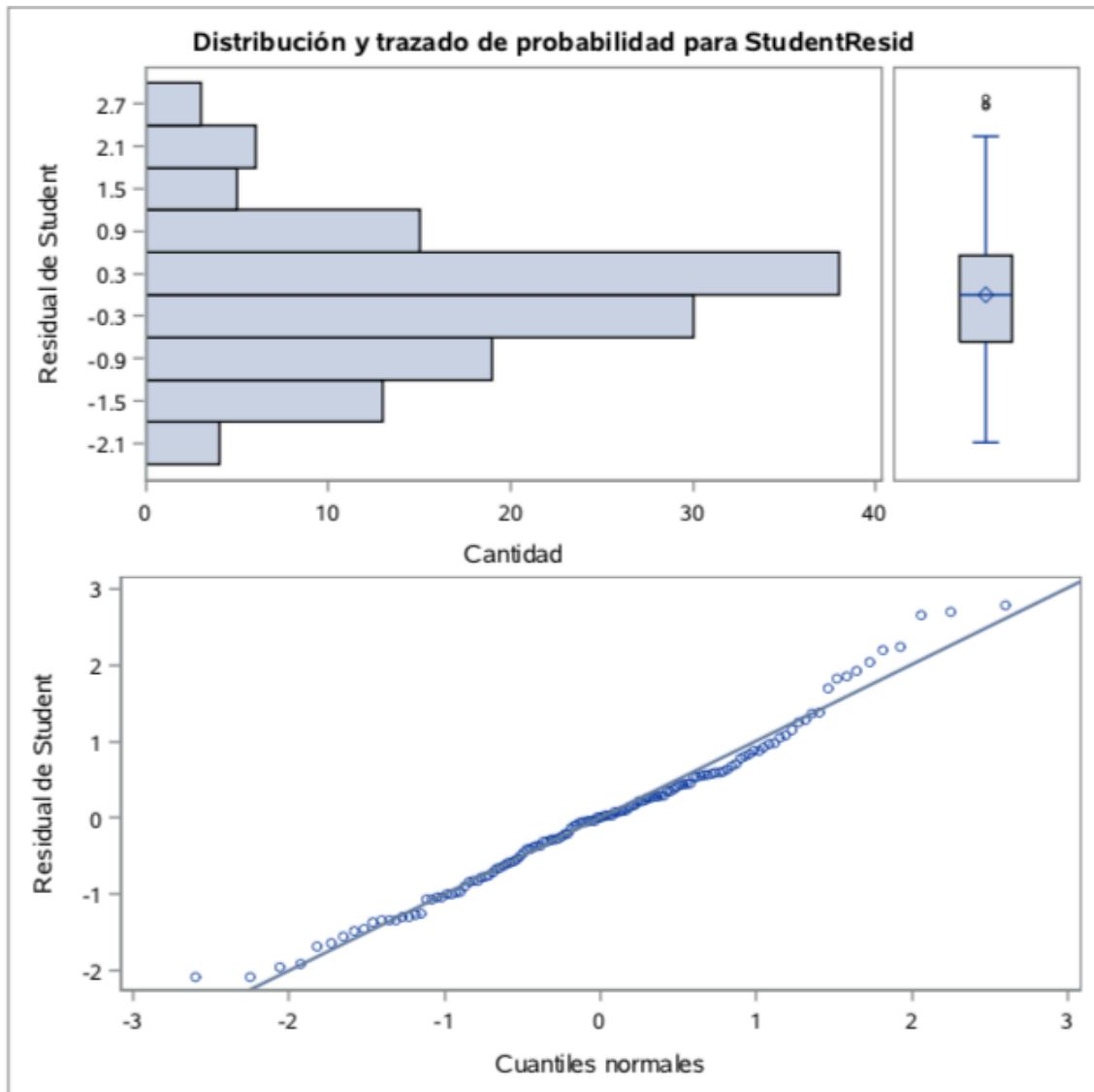


Figura 6. Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable biomasa aérea (g).

1.2.5 Variable biomasa radical

Tabla 7. Resultados generales del análisis de normalidad de los residuales para la variable biomasa radical (g).

N	133	Sumar pesos	133
Media	0	Observ suma	0
Desviación std	1,00378073	Varianza	1,00757576
Asimetría	0,38844538	Curtosis	0,2984178
SC no corregida	133	SC corregida	133
Coef. variación	.	Media error std	0,08703883
Saphiro-wilk	0,0722	Kolmogorov-Smirnov	>0,1500
(P valor)		(P valor)	

**Figura 7.** Distribución y trazado de probabilidad para los residuos estudentizados de la variable biomasa radical (g).