

Primeras tesis doctorales sobre micorrizas

Gisela Díaz¹, Pilar Torres¹, Fernando Sánchez², Gregorio García³ y Catalina Carrillo⁴

1. Departamento de Biología Aplicada, Universidad Miguel Hernández de Elche. Alicante.

2. IES Don Pedro García Aguilera, Moratalla, Murcia. 3. Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria, Universidad Politécnica de Cartagena. 4. Área de Gestión y Divulgación en Espacios Naturales. Orthem.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas son las estructuras resultantes de la asociación simbiótica entre el micelio de un hongo y las raíces de las plantas. Esta simbiosis es obligatoria para ambos organismos y fundamental, por lo tanto, para su desarrollo y establecimiento en los ecosistemas. Se han descrito diferentes tipos de micorrizas en función de las estructuras que los hongos desarrollan en las raíces y que son las responsables del intercambio bidireccional entre los simbioses. Tradicionalmente se distingue entre dos grandes grupos de micorrizas, las ectomicorrizas y las endomicorrizas, entre las que predominan las micorrizas arbusculares. Esta distinción se realiza básicamente en función de que las hifas de los hongos se desarrollen o no en el interior de las células corticales de la raíz.

El Dr. Mario Honrubia, con una amplia experiencia en la Micología y en el conocimiento de la flora fúngica del SE de España, comenzó su andadura en las investigaciones en micorrizas gracias a dos estancias de investigación que supusieron el inicio de su futuro investigador, hoy en día sobradamente conocido. En 1986 se trasladó a la Estación Experimental de Rothamsted (Harpenden, UK), entonces centro de referencia internacional en el estudio de las micorrizas arbusculares, y posteriormente en 1987 al Forest Service (USDA, Corvallis, Oregon USA) para el conocimiento sobre las ectomicorrizas. Las experiencias adquiridas en ambas estancias, unidos al entusiasmo por el inicio de un nuevo campo de investigación, llevaron a la realización de las primeras Tesis Doctorales que fueron la base para futuras y extensas líneas de investigación.

PRINCIPALES APORTACIONES SOBRE MICORRIZAS

Debido a los beneficios que la simbiosis micorrízica reporta a las plantas, el estudio de las micorrizas adquiere un particular interés en ecosistemas degradados. En la Región de Murcia, las actividades derivadas de la minería en las explotaciones de Sierra Minera y Portmán, Cartagena, unido al problema de contaminación por metales pesados (fundamentalmente Pb y Zn) provocan una importante degradación del suelo, lo que produce una alteración de la microbiota del mismo.

Los primeros estudios desarrollados en este ámbito se plasmaron en la tesis Doctoral *Estudio de micorrizas vesículo-arbusculares en suelos afectados por actividades mineras*, dirigida por los Dres. Mario Honrubia y Concepción Azcón-Aguilar (Gisela Díaz Espejo, enero 1992). Se constató que existe una variación estacional en las poblaciones de hongos arbusculares, relacionada con la fenología de la planta hospedadora. La degradación producida por las actividades mineras da lugar a una disminución del potencial infectivo del suelo, de la densidad de esporas y del grado de micorrización en las raíces (Díaz y Honrubia, 1993b; Díaz y Honrubia, 1994). Pero a pesar de las adversas condiciones los hongos micorrízicos no desaparecen por completo, lo que se interpreta como una adaptación al estrés. Se consiguió aislar e identificar las especies *Glomus etunicatum*, *G. invernaium*, *G. geosporum*, *G. mosseae*, *G. pansihlos*, *G. diaphanum*, *Entrophospora infrequens*, *Sclerocystis sinuosa* (Díaz y Honrubia, 1993b) (figura 1).

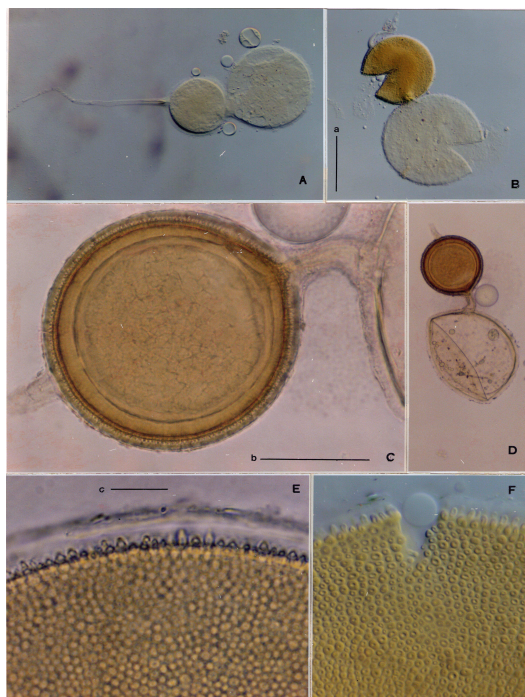


Figura 1. Esporas de *Entrophospora infrequens* (Díaz y Honrubia, 1993b).

El siguiente paso consistió en evaluar los efectos de la inoculación micorrícica en especies vegetales seleccionadas por su valor potencial en la recuperación de suelos (*Anthyllis cytisoides* y *Lygeum spartum*). Tras diversos experimentos se seleccionaron los hongos más compatibles con dichas especies vegetales en términos de mejora del crecimiento, estado nutricional y tolerancia a los metales pesados (*Glomus fasciculatum*, *G. etunicatum*). Se evidenció la conveniencia de inoculación con hongos MA, pues las poblaciones nativas en conjunto se mostraron poco eficaces para estimular el crecimiento de las plantas (Díaz y Honrubia, 1995). Quizá la aportación más interesante fue demostrar que la inoculación con hongos arbusculares protege a las plantas de la toxicidad por Pb y Zn, debido a una mejora en la nutrición fosforada y a una reducción en la concentración foliar de estos elementos (Díaz *et al.*, 1996). La efectividad de la simbiosis parece depender del grado de tolerancia de los hongos a los metales pesados en el suelo. En este sentido se demostró que la presencia de Zn y Pb inhibe la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio en condiciones axénicas, aunque la cepa *G. mosseae* GPR29, aislada de suelo contaminado, mostró un comportamiento diferente al de otras especies. Este ecotipo fue precisamente el más eficiente en la estimulación del crecimiento vegetal en presencia de altas concentraciones de metales en suelo, lo que se interpretó como una estrategia de adaptación ecológica.

Igualmente en el año 1992, y dirigida por el Dr. Mario Honrubia, la Dra. Pilar Torres Martínez presentó la Tesis Doctoral titulada *Estudio de las ectomicorizas del pino carrasco (Pinus halepensis Miller)*. El estudio de la simbiosis establecida entre el micelio fúngico y las raíces de las coníferas es de gran importancia a nivel forestal, especialmente en lo que se refiere a la mejora en el desarrollo de las plántulas y su supervivencia, una vez son trasplantadas desde el vivero al campo. El conocimiento de la flora fúngica asociada al pino carrasco (*Pinus halepensis*) fue el primer paso para iniciar la selección de las especies más adecuadas para su inoculación en vivero. Además, no solo la especie fúngica es fundamental, sino también la forma o tipo de inóculo a emplear. La posibilidad de producir ese inóculo a gran escala y de que su aplicación sea sencilla y económica fue otro de los objetivos que se plantearon en esta Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos en este trabajo aportaron conocimientos sobre la flora fúngica asociada a raíces de *Pinus halepensis*, la selección de los simbiontes más adecuados para la inoculación en vivero de esta conífera, la aplicación de un tipo de inóculo concreto y su eficacia en el desarrollo de ectomicorizas. Se aislaron en cultivo puro más de 25 especies de hongos Basidiomicetos (Torres y Honrubia, 1991, 1993), de los que se comprobó *in vitro* el establecimiento de las simbiosis micorrícica con el pino carrasco (Torres *et al.*, 1991; Torres y Honrubia 1994a). Se demostró que la micorrización de plántulas de pino carrasco mediante el uso de inóculos esporales era una técnica efectiva, sencilla y económica, y por lo tanto fácilmente aplicable en los viveros forestales (Torres y Honrubia 1994b). Se demostró que este tipo de inóculo basado en suspensiones de esporas no mantenía su viabilidad más allá de un mes cuando estas suspensiones se conservaban refrigeradas o congeladas, lo que supuso la base para el estudio de otras formas de conservación para este tipo de inóculos de fácil aplicación (Torres y Honrubia 1994c) (figura 2).

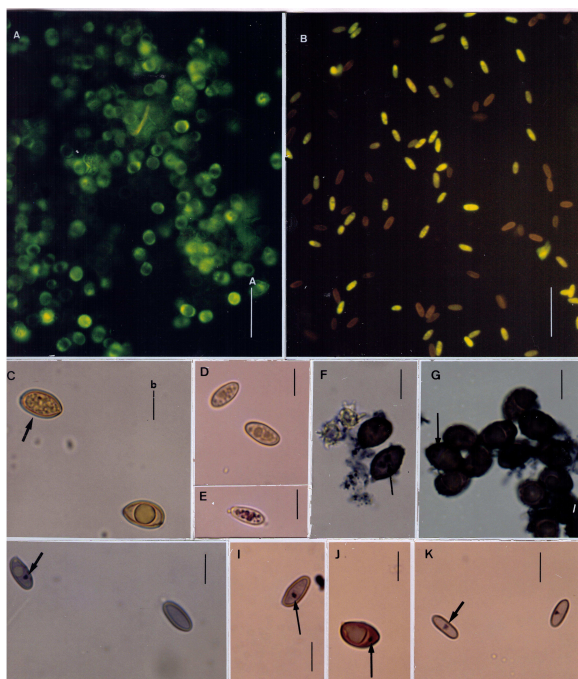


Figura 2. Viabilidad de esporas de Basidiomicetos teñidas con FDA y MTT (Torres y Honrubia 1994c).

En 1991 el Grupo de investigación de Micología-Micorrizas que dirigía el Dr. Mario Honrubia, inició el estudio de las Micorrizas en El Maestrazgo. Este estudio se enmarcaba en el proyecto de investigación del mismo nombre, contratado por ENDESA con la Universidad de Murcia. El planteamiento principal de este proyecto fue el conocimiento del estado micorrícico de los bosques de las comarcas de El Maestrazgo y Els Ports y su posible relación con las emisiones derivadas de la actividad de la Central Térmica de Andorra (Teruel). Como resultado de estas investigaciones el Dr. Fernando Sánchez Sánchez presentó, en el año 1997, la Tesis Doctoral titulada *Hongos ectomicorrícicos de El Maestrazgo. Estudios taxonómico, ecológico y fisiológico* (Directores: Dr Mario Honrubia y Dra. Pilar Torres). Se elaboró un catálogo con 196 táxones de hongos ectomicorrícicos, que supuso la primera aportación al conocimiento de las poblaciones de hongos en el Sistema Ibérico (Sánchez *et al.*, 1998, 1999) (figura 3). Se estudiaron además, aspectos ecológicos de estas especies fúngicas en los distintos sistemas forestales, determinando la fenología de las mismas. Se obtuvieron estimaciones sobre la productividad de los bosques estudiados en términos de biomasa de las fructificaciones recolectadas. Se aislaron en cultivo puro alrededor de 50 especies de hongos ectomicorrícicos, con el objetivo de crear un banco de inóculo micelial que pudiera ser utilizable en trabajos paralelos de micorrización controlada en vivero. Se realizaron también estudios sobre la fisiología del comportamiento de los hongos ectomicorrícicos

frente a cambios de pH, potencial hídrico y temperatura (Sánchez *et al.*, 2001).

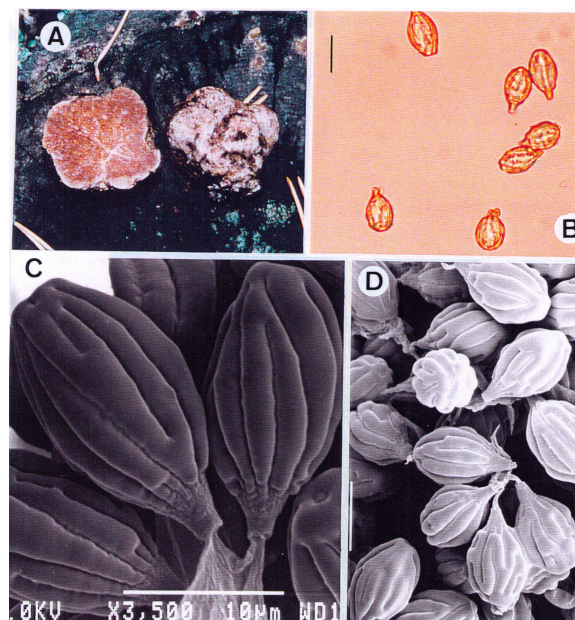


Figura 3. Basidioma y basidiosporas de *Gautieria otthii* (Sánchez *et al.*, 1998, 1999).

La inmensa mayoría de las especies arbóreas presentes en los ecosistemas mediterráneos se asocian con hongos ectomicorrícicos (Honrubia *et al.* 1992). El abanico de posibles combinaciones hongo-planta que se pueden presentar en los ecosistemas forestales es grande. En esta línea, se desarrolla la Tesis doctoral *Caracterización y Aspectos Dinámicos del Componente ectomicorrícico de los Ecosistemas forestales mediterráneos*, dirigida por el Dr. Mario Honrubia (Gregorio García Fernández, 1998). Esta tesis doctoral se centró en la caracterización, biodiversidad y ecología del componente ectomicorrícico de los ecosistemas forestales mediterráneos. Se caracterizaron y herborizaron un total de 115 morfotipos de ectomicorrizas: 22 de ellos asociados a *Pinus halepensis* (figura 4), 36 a *P. nigra*, 37 a *P. sylvestris* y 20 a *Quercus rotundifolia*. Se determinaron también los valores basales, así como las pautas de variación de las poblaciones de los propágulos ectomicorrícicos en un gradiente espacial y temporal. Así, por ejemplo, se observó una variación en las poblaciones de *Cenococcum geophyllum*, con menor producción en pinares de pino carrasco que en el resto. Se analizaron, igualmente, las pautas de variación temporal de los distintos morfotipos detectados, así como las claras correlaciones mostradas por los tamaños poblacionales tanto de esclerocios como de ectomicorrizas con diversos parámetros climáticos. Por último, se abordó el estudio de las interacciones existentes entre los micelios fúngicos de especies ectomicorrícicas con la finalidad de conseguir una

interpretación más realista de su comportamiento dentro de los ecosistemas forestales (García *et al.*, 1996).

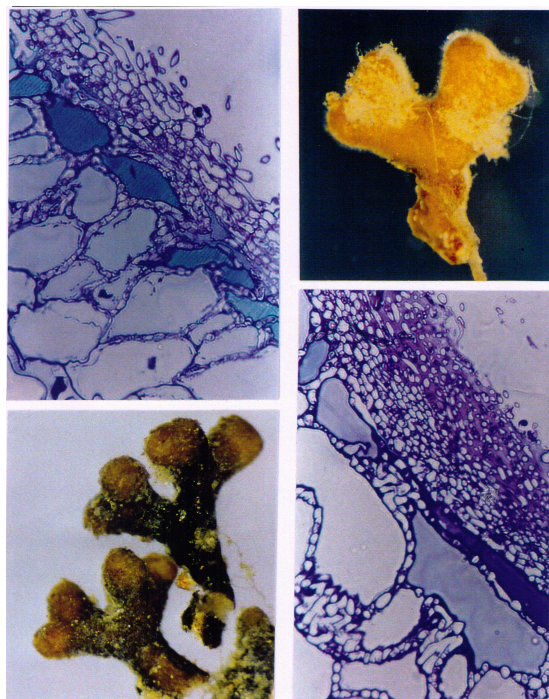


Figura 4. Morfotipos ectomicorrícicos en *Pinus halepensis*. (García *et al.*, 1996).

Los beneficios que aportan las micorrizas a la plantas son bien notables y le confieren ventajas frente a las no micorrizadas. La adecuada selección de hongos y la posterior manipulación de las micorrizas permiten obtener planta forestal de calidad, por lo que las plantas sometidas a micorrización controlada aumentan sustancialmente su viabilidad. Con esta idea de aplicación práctica se desarrolló la Tesis doctoral *Producción de inóculo de hongos ectomicorrícicos y micorrización controlada de Pinus halepensis Miller en vivero*, (Catalina Carrillo Sánchez, 2000), dirigida por los Dres. Mario Honrubia y Gisela Díaz y realizada en el marco del convenio ICONA-Universidad de Murcia *Estudio y selección de cepas de hongos ectomicorrícicos, su reproducción y aplicación en vivero y en repoblaciones de tierras agrarias excedentarias*. Se adaptó y optimizó el cultivo en fermentadores a la producción de inóculo miceliar de *Suillus collinitus*, *S. mediterraneensis* y *Lactarius deliciosus* (Díaz *et al.*, 2004). Asimismo, se optimizaron las condiciones de producción y conservación de inóculos en gel de alginato y suspensiones miceliarias. Tras diversos experimentos de inoculación en vivero se comprobó que los fungicidas y herbicidas, a dosis moderadas, son compatibles con la producción de planta micorrizada (Díaz *et al.*, 2011), que un incremento de la fertilización nitrogenada se traduce en una disminución de la micorrización (Díaz *et al.*, 2010) y que un

régimen de riego reducido y un sustrato que permita aireación favorecen la micorrización. Se determinó el tipo y dosis de inóculo ectomicorrícico más efectivo (p.ej. suspensión miceliar para *Lactarius deliciosus*, micelio en sustrato de turba-vermiculita para *P. tinctorius*) (figura 5). Como resultados notables, se evidenció que la micorrización con la especie comestible *L. deliciosus* LDF5 es factible a media-gran escala (Díaz *et al.*, 2009) y que la cepa *P. tinctorius* 3SR es una excelente candidata para programas de inoculación en vivero con *Pinus halepensis*.

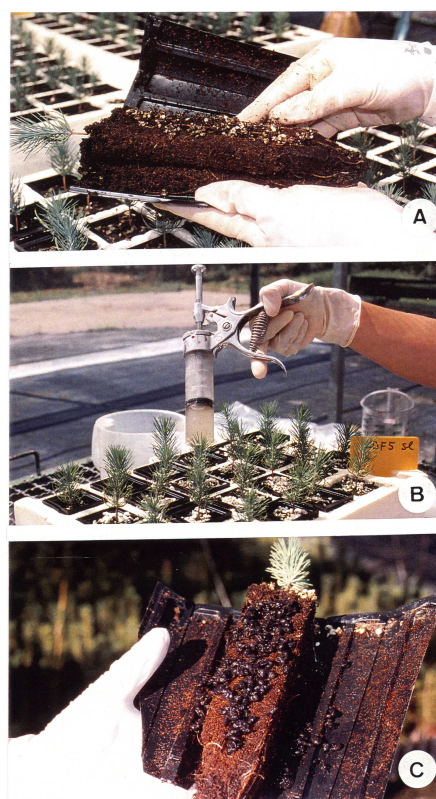


Figura 5. Inoculación de *Pinus halepensis* con diferentes tipos de inóculo ectomicorrícico miceliar (Díaz *et al.*, 2009).

AGRADECIMIENTOS

Más allá del interés científico de estos estudios, los resultados aquí expuestos son consecuencia del entusiasmo y la ilusión por nuevas líneas de trabajo, del trabajo en equipo y la estrecha colaboración entre compañeros y de la capacidad de suplir con esfuerzo, tesón y dedicación las dificultades de todo tipo surgidas a lo largo de los años en que se llevaron a cabo. El Dr. Mario Honrubia inició la línea de investigación en Micorrizas en la Universidad de Murcia, y a día de hoy sigue siendo para algunos de nosotros el principal motor de nuestra carrera científica. Por este motivo nuestro más sincero agradecimiento.



Figura 6. Mario Honrubia y el equipo investigador en 1993.

REFERENCIAS

- Carrillo, C., Díaz, G. y Honrubia, M. (2004). Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content. *Eng. Life Sci.* 4 (1), 43-45.
- Díaz, G. y M. Honrubia, M. (1993a). Infectivity of mine soils from South-East Spain. II. *Mycorrhiza*. 4, 85-88.
- Díaz, G. y Honrubia, M. (1993b). Notes on *Glomales* from Spanish semiarid lands. *Nova Hedwigia*. 57, 159-168.
- Díaz, G. y Honrubia, M. (1994). A mycorrhizal survey of plants from mine wastes from south-East Spain. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 8, (1): 59-68.
- Díaz, G. y Honrubia, M. (1995). Effect of native and introduced mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Biología Plantarum*. 37, 121-129.
- Díaz, G., Azcón-Aguilar, C. y Honrubia, M. (1996). Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Plant and Soil*. 180, 241-249.
- Díaz, G., Carrillo, C. y Honrubia, M. (2009). Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. *New Forests*. 38, 215-227.
- Díaz, G., Carrillo, C. y Honrubia, M. (2010). Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Annals of Forest Science*. 67, 405-413.
- Díaz, G., Carrillo, C. y Honrubia, M. (2011). Testing the effect of routine fungicide application on ectomycorrhiza formation on *Pinus halepensis* seedlings in a nursery. *Forest Pathology*. 41 (1), 70-74.
- García, G., Díaz, G., Honrubia, M., Torres, P., Sánchez, F. y Pérez, P. (1996). Dynamics of Ectomycorrhizal Populations in the Mediterranean forests of the sistema Ibérico Mountains. **En:** *Mycorrhizae in Integrated Systems*. From Genes to Plant Development. Proceedings of the fourth European Symposium on Mycorrhizas. Final Report. pp: 114-117.
- Honrubia, M., Torres, P., Díaz, G. y Cano, A. (1992). *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Monografías 54, ICONA, Madrid.
- Torres, P. y Honrubia, M. (1991). Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo. *Cryptogamie (Mycologie)*. 12(3): 183-192.
- Torres, P. y Honrubia, M. (1993). Descripción de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Bol. Soc. Micol. Cast.* 18: 163-170.
- Torres, P. y Honrubia, M. (1994a). Ectomycorrhizal associations proven for *Pinus halepensis*. *Israel Journal of Plant Sciences*. 42: 51-58.
- Torres, P. y Honrubia, M. (1994b). Inoculation of containerized *Pinus halepensis* seedlings with basidiospores of *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* and *Suillus collinitus*. *Annales des Sciences Forestieres*. 51(5): 521-528.
- Torres, P. y Honrubia, M. (1994c). Basidiospore viability in stored slurries. *Mycological Research*. 98(5): 527-530. (1994).
- Torres, P.; Honrubia, M. y Morte M.A. (1991) In vitro synthesis of ectomycorrhizae between *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. with *Pinus halepensis* Miller. *Mycotaxon*., 41(2): 473-445.
- Sánchez, F., Honrubia, M. y P. Torres (1998). Hongos ectomicorrícicos en El Maestrazgo. IV. Orden Boletales. *Bol. Soc. Micol. Madrid*. 23:29-41.
- Sánchez, F., Honrubia, M. y P. Torres (2001). Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from mediterranean forests. *Cryptogamie (Mycologie)*. 22(4): 243-258.
- Sánchez, F., Courtecuisse, R., Honrubia, M. y P. Torres (1999).: Hongos ectomicorrícicos en El Maestrazgo. V. Orden Russulales. *Bol. Soc. Micol. Madrid*. 24:3-10.