

ARTICULOS GENERALES

Influencia del pH en el desarrollo *in vitro* de cinco especies de hongos ectomicorrícicos

Influence of pH on the *in vitro* growth of five ectomycorrhizal fungi

Florence Dorothée Sianard¹, Serge Valentin Pangou^{2*}, Antoine Mountanda³.

1. Centre d'Etude sur les Ressources Végétales, avenue de l'Auberge de Gascogne, BP 2499, Brazzaville, Congo.

2*. Groupe d'Etude et de Recherche sur la Diversité Biologique, avenue de l'Auberge de Gascogne, BP 876 Brazzaville, Congo.

3. Service National de Reboisement, Pointe-Noire, Congo.

E-mail: droguedgrst@yahoo.fr ; serge_pangou@yahoo.fr ; mountandaantoine@yahoo.fr

RESUMEN. Este trabajo examina el efecto del pH del medio de cultivo sobre el desarrollo *in vitro* de cinco especies de hongos ectomicorrícicos *Scleroderma* sp. y *Suillus bellinii* recolectados en plantaciones de *Pinus caribea*. El material fúngico fue aislado a partir de carpóforos y cultivado en medio nutritivo con pH ajustado a 4,6; 5,6; 6,6 y 7,6, e incubado durante 28 días a 24 ± 1 °C. Fueron evaluados la velocidad de crecimiento radial, el área de crecimiento de las especies de las colonias y la variación de pH del medio. Los resultados indicaron que una variación de pH entre 4,6 y 7,6 tiene efecto significativo sobre la velocidad y el área final de crecimiento de las dos especies fúngicas *Scleroderma* sp. alcanzó los mayores crecimientos, en velocidad y área, en los valores de pH 5,8 y 6,8. Para *S. bellinii* la mayor velocidad y área de crecimiento fueron observadas a pH 4,8 y 5,8, respectivamente. En la variación de pH experimentada por los medios nutritivos de ambas especies disminuyeron el pH de los medios, siendo esto más evidente en los tratamientos de mayor pH inicial. Estos resultados indicaron también que el pH del medio de cultivo es determinante en el comportamiento de las especies de hongos ectomicorrícicos *in vitro*. Esto será de gran importancia en la selección de nuevas especies ectomicorrícicos para producir inóculo micelial en grandes cantidades para ser aplicado en programas de micorrización de plantas en viveros forestales.

Palabras clave: Crecimiento, material fúngico, medio de cultivo, propagación *in vitro*, variación del pH.

ABSTRACT. This study examines the effect of the pH on the *in vitro* growth of the ectomycorrhizal fungi *Scleroderma* sp. and *Suillus bellinii* recollected from collected from *Pinus caribaea* plantations. The fungal cultures were grown on solid medium with pH adjusted to 4.6, 5.6, 6.6 and 7.6 and incubated for 28 days at 24 ± 1 °C. Was evaluated the radial growth rate, the area of the colonies and the pH changes of the media. The results showed that a variation of pH from 4.6 to 7.6 affected significantly the growth rate and the final area of colonies of the two fungi. For *Scleroderma* sp. the highest rate of growth and colony area occurred at pH 5.8 and 6.8; while for *S. bellinii*, the highest growth rate and colony area were observed at pH 4.8 and 5.8, respectively. When the changes in the pH cultures at the end of incubation period were investigated, it was observed that all fungal species reduced the pH of the media acidifying it in a lesser or larger extent, being this effect more intense for the cultures with higher initial pH. These results suggest that the pH of culture medium is determinant of the *in vitro* behaviour of the ectomycorrhizal fungal species. This is very important for the selection of new ectomycorrhizal species for large-scale inoculum production for application in programs of plant mycorrhization in forest nurseries.

Key words: culture medium, fungal material, growth, *in vitro* propagation, pH variation.

INTRODUCCIÓN

El pH es una de las variables consideradas como una de las propiedades químicas más importantes del suelo debido al significativo efecto que ejerce tanto sobre las características físicas, químicas y biológicas de éste, como también sobre el rendimiento de los

cultivos (Jackson, 1970; Guillermo *et al.*, 2005; Guigon *et al.*, 1989; Saña *et al.*, 1996; Cepeda, 1999). Para Jackson (1970), y Guillermo *et al.* (2007), el pH es un indicador de gran importancia por su papel en la determinación desde punto de vista

biológico del tipo de organismo que se desarrolle sobre un suelo, debido a su significativa influencia sobre la disponibilidad de nutrientes (Jackson, 1970; Le Tacon et al., 1987; Guillermo et al., 2007). Se afirma por muchos autores que los hongos y el grupo de bacterias-actinomicetos constituyen los dos grandes grupos de microorganismos del suelo y el predominio de uno u otro grupo depende de las condiciones locales, especialmente del pH y del contenido de humedad (Harley y Smith, 1983; Barea, 1991; Honrubia et al., 1992; Brundrett et al., 1996). Entre estos microorganismos se encuentran los hongos micorrícicos, con los cuales la mayoría de las plantas viven en simbiosis (Rehead, 1960; Fassi y Moser, 1991, Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991). Esta asociación presenta múltiples beneficios para las plantas, entre los que se pueden destacar el aumento en la absorción de agua y nutrientes minerales, mayor crecimiento y supervivencia de las plantas, protección frente a infecciones de organismos patógenos y estrés ambiental (Gianinazzi-Person y Azcón-Aguilar, 1991; Honrubia et al., 1992). Se debe tener presente que el desarrollo y actividad de los hongos micorrícicos puede verse afectado por diversos factores del sitio, y que además cada especie fúngica (cepa o ecotipo) tiene sus propias limitaciones ecológicas, existiendo por ello algunos más benéficos que otros en determinadas condiciones ambientales.

Por ello la adecuada selección de las especies de hongos micorrícicos como simbiosistas y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de muchas especies vegetales en campo (Honrubia et al., 1992; Marx et al., 1994). En este intento las primeras especies a estudiar deben ser siempre aquellas que se encuentran creciendo en forma natural en los sitios de interés, más aún si ellas son consideradas pioneras en el establecimiento de algunos sistemas boscosos, como es el caso de las pertenecientes a los géneros *Scleroderma* y *Suillus* que son corrientes en las formaciones boscosas húmedas del Congo.

Dentro de este contexto, el objetivo de este estudio fue analizar bajo condiciones controladas de laboratorio el efecto del pH del medio de cultivo sobre el crecimiento *in vitro* de dos especies ectomicorrícicas, comúnmente encontradas en plantaciones de *Pinus* y *Eucalyptus* en Congo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron los hongos ectomicorrícicos *Rhizopogon luteolus* Fr., *Scleroderma cepa* Pers., *Scleroderma Verrucosum* Pers., *Suillus ganuletus* (Berk. & Curt.) Murr, *Suillus bellinii* (Inz.) Kuntze recolectados de plantaciones jóvenes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* de dos sitios de arenas de baja productividad de la provincia del Pool, a Kintélé a 45 km al norte de Brazzaville, Congo.

Algunas propiedades físicas y químicas de los suelos de estos sitios fueron analizadas en el laboratorio de suelo y micología del *Centre de Recherche sur la Conservation et la Restauration des Terres* (cuadro 1). Estas especies fueron identificadas a través de características macroscópicas y microscópicas de sus cuerpos fructíferos y con la ayuda de unas claves de identificación existentes (Moreno et al., 1996; Valenzuela, 1998; Gerhardt et al., 2000; Lazo, 2001). El material fúngico recolectado en campo fue trasladado a laboratorio, donde bajo condiciones de asepsia se diseccionaron los carpóforos extrayendo tejido ubicado inmediatamente por encima del himenio en el caso de los hongos epígeos (setas) y en la zona central de la gleba en los hongos hipógeos (Honrubia et al., 1995; Brundrett et al., 1996). Los fragmentos de tejido fueron depositados en placas de Petri con 20 mL de medio de cultivo BAF (biotina-aneurina-ácido fólico agar) (Honrubia et al., 1995), ajustado a pH 5,6. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 24 ± 1 °C, hasta obtener un crecimiento activo de los micelios (cultivos *stock*). Posteriormente, discos de micelio de 5 mm de diámetro, obtenidos de los cultivos *stock* fueron transferidos a nuevas placas con 20 mL de medio nutritivo BAF, con pH ajustado a 4,6; 5,6; 6,6 y 7,6. Estas placas fueron incubadas a 24 ± 1 °C durante 28 días, período en el cual se midió cada tres días el crecimiento radial de las colonias por el reverso de las placas con pie de metro digital siguiendo la metodología desarrollada por Lazo (2001). Estos datos se ajustaron mediante una ecuación de regresión lineal para calcular la pendiente de la curva de crecimiento que corresponde a la velocidad media de crecimiento de cada especie fúngica, expresada en mm/día. (Santiago-Martínez et al., 1995; Vázquez-García et al., 2002)

Finalizado el período de cultivo se determinó el área final de crecimiento (cm²), graficando el perímetro

de las colonias sobre papel y evaluando esta variable en un medidor de área digital (modelo LI-3100). Para cada uno de los tratamientos fue determinado el valor de pH final de los medios de cultivo (previa disolución en horno de microondas) utilizando un potenciómetro marca EXTECH modelo 321990, provisto de un electrodo de pH para medio líquido. El estudio se estableció bajo un diseño completamente aleatorio, considerando tres repeticiones por tratamiento (Montgomery, 1991). Los resultados obtenidos fueron evaluados a través de análisis de varianza y cuando hubo diferencias significativas entre tratamientos, éstas se identificaron a través de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. (Steel y Torrie, 1989)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Velocidad media de crecimiento

Los resultados muestran que la variación de pH del medio tuvo efecto sobre la velocidad de crecimiento de *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma Verrucosum* y *Suillus bellinii* (figura 1). Se observa que *R. luteolus* presentó las mayores velocidades medias de crecimiento, independiente del rango de pH estudiado. La máxima velocidad de crecimiento para esta especie se encontró en los tratamientos a pH 5,6 y 6,6 (1,99 y 1,81 mm/día, respectivamente), resultados que alcanzaron significación estadística al ser comparados con los tratamientos a pH 4,6 y 7,6 (1,37 y 1,01 mm/día, respectivamente), donde se lograron los menores crecimientos. *Scleroderma cepa* fue la segunda especie con mayor crecimiento, logrando su máxima velocidad en el tratamiento a pH 4,6 (1,92 mm/día), velocidades que decrecieron al aumentar el pH del medio (figura 1), produciéndose diferencias significativas entre el crecimiento de las colonias cultivadas en medio nutritivo a pH 4,8 con respecto las colonias cultivadas a pH 7,6 (0,98 mm/día). *Scleroderma Verrucosum* fue la tercera al lograr su máxima velocidad en el tratamiento a pH 5,6. *Suillus bellinii* por su parte, presentó mayor velocidad de crecimiento en el tratamiento a pH 4,6. Se observó que *Suillus ganuletus* presentó la menor velocidad de crecimiento, superando sólo a *S. bellinii* en el tratamiento a pH 6,6. Las velocidades de crecimiento de esta especie no presentaron diferencias estadísticas, independientemente de los valores de pH ensayados.

Área media de crecimiento

El área de crecimiento de las cinco especies ectomicorrícicas también se vio afectada por la variabilidad del pH del medio (figura 2). Se observa que *Rhizopogon luteolus* fue la especie con mayor área de crecimiento en todas las condiciones de pH estudiadas, alcanzando un área de crecimiento significativamente mayor en los cultivos a pH 5,6 y 6,6 (43,7 y 33,5 cm²), respecto a los obtenidos a pH 4,6 y 7,6. Por otra parte, se observó que la especie *S. cepa* logró sus máximos crecimientos en área total en los cultivos a pH 5,6 y 6,6 (17,0 y 31,9 cm², respectivamente), disminuyendo a medida que aumentó o bajó el valor del pH, existiendo diferencias significativas entre el cultivo a pH 5,6, respecto de las colonias cultivadas a pH 4,6 y 7,6 (figura 2). La especie *S. Verrucosum* tuvo un comportamiento similar a *S. cepa*, logrando su mayor área total de crecimiento a pH 5,6 (14,8 cm²), mientras que los menores valores se obtuvieron a pH 4,6 (9,2 cm²) y pH 7,6 (11,3 cm²). Sin embargo, en este caso las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. *S. bellinii* logro su mayor área de crecimiento a pH 4,6 y *S. ganuletus* por su lado alcanzó un área de crecimiento a pH 5,6 pero aquí tampoco las diferencias observadas fueron significativas.

Variación de pH del medio de cultivo

Los resultados indican que las cinco especies de hongos ectomicorrícicos provocaron cambios en el pH del medio de crecimiento, respecto al pH inicial, tendiendo siempre hacia la acidificación (cuadro 2). Se observó que el grado de acidificación aumentó a medida que el valor de pH inicial del medio fue mayor (cuadro 2). De las tres especies ectomicorrícicas, *S. bellinii* fue la que más acidificó el medio en todos los tratamientos, experimentando cambios de 0,31 unidades de pH en las colonias cultivadas a pH 4,6, alcanzando cambios de hasta 2,21 unidades para aquellas cultivadas a pH 7,8. Por otro lado, *S. luteus* fue la especie que menos modificó el pH del medio de crecimiento respecto al inicial, excepto en el tratamiento a pH 4,6.

El crecimiento *in vitro* de las especies de hongos ectomicorrícicos respondió de forma diferente a los distintos valores de pH inicial del medio de

cultivo ensayados. De las cinco especies, *R. luteolus* fue la que presentó los mayores crecimientos, alcanzándose los máximos valores tanto en velocidad como en área en los pH 5,6 y 6,6. Al respecto Vázquez-García *et al.* (2002) y Guillermo *et al.* (2007), en un estudio similar con cepas de *Rhizopogon* sp., encontraron los óptimos de crecimiento en pH 6,0 y pH 5,8, respectivamente, con velocidades medias (1,28 mm/día y 1,34 mm/día) inferiores a las obtenidas en este estudio. Por otra parte, estudios realizados por Torres y Honrubia (1991), con seis especies de hongos ectomicorrícicos recolectados de bosques de *Pinus* sp., mostraron que *R. luteolus* y *R. roseolus* presentaron sus máximos de crecimiento en valores de pH mayores a 7,2.

Los resultados encontrados muestran que, en general, las especies *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma Verrucosum* y *Suillus bellinii*, tienden a crecer mejor en condiciones de acidez que de alcalinidad, siendo el tratamiento a pH 7,6 el que más afectó la velocidad media de crecimiento (figura 1), resultados que concuerdan con los estudios de Hung y Trappe (1983), Willenborg *et al.* (1990) y Hormilla (1995), en el sentido de que los hongos ectomicorrícicos tienen una naturaleza acidófila cuando crecen en condiciones de cultivos puros. Por otra parte, al analizar los valores de pH donde se alcanzaron los mayores crecimientos de las tres especies de hongos ectomicorrícicos (figuras 1 y 2) se observa que, en general, el mejor comportamiento que presentan los hongos cultivados *in vitro* se produce en medios nutritivos cuyo pH es similar a aquel registrado en los suelos en donde éstos estaban creciendo en forma natural (cuadro 1). Ello indica que las condiciones de pH del sector de colecta del material fúngico deben ser consideradas para optimizar el cultivo y propagación de los hongos en laboratorio y, por ende, para mejorar la micorrización en la producción de plantas en vivero.

La tendencia general de las especies estudiadas es acidificar los medios de crecimiento (cuadro 2), siendo *S. bellinii* la que más acidificó los medios y *S. luteus* la que menos cambios produjo. Se debe destacar que ambas especies provenían del mismo sitio de colecta, por lo cual esta diferencia en comportamiento pudiese estar relacionada con las

estrategias propias de cada especie para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes. De acuerdo con algunos autores (Hung y Trappe, 1983; García-Rodríguez *et al.*, 2006) durante el desarrollo del micelio *in vitro* de hongos ectomicorrícicos se producen una serie de ácidos orgánicos, además de la absorción de iones, lo que provocaría la acidificación del medio de cultivo. Ello sugiere que debería existir una correlación entre un mayor crecimiento de la especie (velocidad y/o área) y una mayor disminución de pH del medio, lo cual no se observa en los resultados obtenidos en este estudio. Al respecto Sánchez (1997) y Sánchez *et al.* (2001), estudiando especies similares, no consiguieron relacionar la mayor producción de biomasa con un mayor descenso del pH del medio. Los resultados encontrados en este estudio sugieren que en la búsqueda de la optimización planta-hongo-sitio, para algunas especies de hongos ectomicorrícicos, se debe tener en consideración la variable pH del medio de crecimiento, pues ello permitirá al silvicultor optimizar el crecimiento de las especies fúngicas en laboratorio, mejorar la micorrización de las plantas en vivero, así como también elegir el sitio más adecuado para que el hongo micorrícico con su respectiva planta huésped expresen el máximo potencial de desarrollo.

En este sentido se hace necesario aumentar los conocimientos de las especies micorrícicas que están creciendo en bosques húmedos del Congo, y de esta forma poder seleccionar para las micorrizaciones en viveros aquellas que sean más idóneas para potenciar el crecimiento en campo (Khasa *et al.*, 1990). A su vez, en laboratorio se hace necesario estudiar metodologías y condiciones de cultivo (pH, temperatura y composición de los medios) más adecuadas para cada especie de interés, y así poder conseguir en periodos cortos de tiempo producciones masivas de inóculos que puedan ser utilizadas a escala operacional en los viveros forestales. Se debe destacar que las cinco especies en estudio, pertenecientes a los géneros *Rhizopogon* *Suillus* y *Scleroderma* son recurrentes en las plantaciones de *Pinus* y de *Eucalyptus* y también en bosques naturales con dominancia de especies de leguminosas y se presentan con mayor o menor abundancia dependiendo de las condiciones edafoclimáticas de los sitios (Redhead, 1982; Le Tacon *et al.*, 1989). Estas especies son consideradas

pioneras en el establecimiento de algunos sistemas boscosos, condición que les proporciona un alto potencial para ser consideradas en micorrizaciones controladas. (Duddridge et al., 1980; Le Tacon et al., 1987)

CONCLUSIONES

El pH del medio de cultivo tiene efectos significativos sobre el crecimiento *in vitro* del micelio vegetativo de *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma Verrucosum* y *Suillus bellinii*. De las cinco especies de hongos ectomicorrícicos, *R. luteolus* presentó los mayores crecimientos, independiente de los tratamientos probados, indicando el alto potencial que presenta esta especie para ser usada en programas de inoculación bajo diferentes condiciones de pH en los suelos. En general, los valores de pH del medio de cultivo donde se observaron los mayores crecimientos se correlacionan con los valores de pH de los suelos, donde los hongos crecían en forma natural. El crecimiento de estos hongos disminuyó el pH del medio de cultivo, siendo este efecto más evidente en los cultivos donde el pH inicial fue de 7,6.

BIBLIOGRAFÍA

1. Francllet, A.; M. Boulay; F. Bekkaoui; Y. Fouret et al.: Rejuvenation, en Bonga, J y Durzan, D (Eds) Tissue culture in forestry. Dordrecht. The Netherlands, pp., 232-248, 1987.
2. Barea, J.M.: "Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Advances in Soil Science* 15:1-40, 199
3. Brundrett, M.; N. Bougher; T. Grove and N. Malajczuk: Working with mycorrhizas in forestry and agriculture, Canberra, ACIAR, 1996.
4. Duddridge J; R. Larrousse and D. Laurent: "The influence of mycorrhizal rhizomorphs with special reference with their role in water transport". *Nature* (Lond.), 287: 834-836, 1980.
5. Cepeda, J.: *Química de suelos*, México, Editorial Trillas, 1999.
6. Fassi, B. and M. Moser: Micorrize nelle foreste naturali nell'Africa tropicale e nei Neotropici, en *Funghi, Piante e Suelo*. Centro di Suelo sulla Micologia del Terreno, pp. 157-182, CN., Torino, 1991.
7. García-Rodríguez, J.L; J. Pérez-Moreno; A. Aldrete; V. Cetina- Alcalá y H. Vaquera-Huerta: "Caracterización del hongo silvestre ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coke et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino", *Agrociencia* 40:665-676, 2006.
8. Gerhardt, E.; J. Vila y X. Llimona: *Hongos de España y de Europa*, Omega Barcelona, España, 2000.
9. Gianinazzi-Person, V. y C. Azcón-Aguilar: Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares, en Olivares, J. y Barea, J.M. (Eds). Fijación y movilización biológica de nutrientes. CSIC. II. Granada, España, pp., 175-201, 1991.
10. Guigon B.; B. Thonnellier ; B. Duzan y B. Felix-Faure: " Pour valoriser les analyses de sol". *Purpar* 134:3-88, 1989.
11. Guillermo Pereira, C.A.; Jaime Herrera, Angela Machuca H.A. y Manuel Sánchez O.B. "Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*" *BOSQUE* 28(3): 215-219, 2007.
12. Harley J.L. and Smith: *Mycorrhizal symbiosis*. London, UK, Academic Press, 483 p.p., 1983.
13. Honrubia M; P. Torres; G. Díaz y A Cano: Manual para micorrizar plantas en viveros forestales, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España, ICONA, 1992.
14. Honrubia M.; P. Torres; G. Díaz y A. Morte: *Biología Forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas*, Murcia, España, 1995.
15. Hormilla, S.: Estudio de la simbiosis ectomicorrícica en *Quercus robur* L. y valoración de su influencia en la fisiología de la planta, Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco, 1995.
16. Hung, L. and J.M. Trappe: "Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*", *Mycologia* 75:234-241, 1983.
17. Jackson, M.L.: *Análisis químico de suelos*, Omega, Barcelona, España, 1970.

- 18.Khasa, P.; V.Furlan and K. Lumande: Symbioses racinaires chez quelques essences forestières importantes au Zaire. Bois et Forêts des Tropiques 224 : 27-33, 1990.
- 19.Lazo, W.: Hongos de Chile. Atlas micológico. Santiago, Chile, 2001.
- 20.Le Tacon, F.; J.Garbaye and G.Garr: "The characteristics of mycorrhizas in temperate and tropical forests", *Symbiosis*, 3: 179-206, 1987.
- 21.Le Tacon, F.; J.Ba A; Garbaye; A. Beddiar Fraga y Diagne: L'importance des symbioses racinaires pour les arbres forestiers en zone tropicale sèche et en zone tropicale humide. En Trees for development in Sub-Saharan Africa. Proceedings of a regional seminar held by the International Foundation for Science (IFS). ICRAF House, Nairobi, Kenya, February 20-25, pp., 302-313, 1989.
- 22.Marx, D.H.; J.L. Ruehle y D.E. Cordell: Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza, en Norris, J.R. Read, D. y Varna: A.K. (Eds). Techniques for Mycorrhizal Research, Methods in Microbiology, pp. 383-411, 1994.
- 23.Montgomery, D.: Diseño y análisis de experimentos, México D.F., México, Grupo Editorial Iberoamérica, 149 pp., London, UK, Academic Press, 1991.
- 24.Moreno, B.; F. Jiménez; J.Gómez y F.Infante: Setas de Andalucía, Sevilla, España, 1996.
- 25.Redhead, J.F.: Ectomycorrhizae in the tropics. en Dommergues, Y.R. y Diem H.G. (eds). Microbiology of tropical soil and plant productivity. The Hague Nijhoff/junk, pp., 209-251, 1982.
- 26.Rehead, J.F.: A study of mycorrhizal associations in some trees of western Nigeria. Diploma Thesis, Oxford Univ, 210 pp., 1960.
- 27.Sánchez, F.: Hongos ectomicorrícicos del Maestrazgo: Estudio taxonómico, ecológico y fisiológico, Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 1997.
- 28.Sánchez, F.; M. Honrubia y P. Torres: "Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* culture of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests", *Cryptogamie Mycologie* 22:243-258, 2001.
- 29.Saña, J.; J. More and A Cobi: La gestión de la fertilidad de los suelos, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España, 1996.
- 30.Santiago-Martínez, G; L.Varela; A.Estrada-Torres y V. Cuaxilo: "Efecto de seis medios de cultivo sobre el crecimiento de tres cepas de *Pisolithus tinctorius*", *Revista Mexicana de Micología* 11:57-68, 1995.
- 31.Steel, R. and J.Torrie: *Bioestadística: Principios y procedimientos*, México D.F., México, 2ª ed., McGraw Hill, 1989.
- 32.Torres, P. and M.Honrubia: "Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo", *Cryptogamie Mycologie* 12:183-192, 1991.
- 33.Vázquez-García, A.; G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres: "Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos", *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 73:1-15, 2002.
- 34.Valenzuela, E: Guía de campo para setas (Agaricales) de la Isla Teja, Valdivia. Valdivia, Chile, 1998.
- 35.Wild, A.: Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell, Ediciones Mundi-Prensa, pp., 471-494, Madrid, España, 1992.
- 36.Willenborg, A.; D.Schmitz and J.Lelley: " Effects of environmental stress factors on ectomycorrhizal fungi in vitro". *Canadian Journal of Botany* 68:1741-1746, 1990.

Recibido: 26/05/2009

Aceptado: 18/10/2010