



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias



Trabajo Final de Graduación Modalidad PASANTÍA

Entrenamiento en la metodología de muestreo, aislamiento y cultivo de hongos ectomicorrícicos comestibles asociados a pinos



Pasante

Somrau, Alex Ernesto

Asesor

Ing. Agr. Romero, Amalia María Eugenia



Año 2021

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
Etapa 1: Recolección e identificación de hongos ectomicorrícicos	3
A_ Colección de hongos asociados a forestaciones implantadas en el NEA.	3
B_ Análisis macroscópico y microscópico de los ejemplares coleccionados.	4
Etapa 2: Aislamiento de los ejemplares seleccionados	6
Etapa 3: Producción de inóculo.....	8
Etapa 4: Ensayo de inoculación en pino	9
Preparación de sustrato	9
Estratificación de semillas y siembra.....	11
Seguimiento del ensayo	11
RESULTADOS.....	16
Etapa 1: Recolección e identificación de hongos ectomicorrícicos	16
Análisis microscópico	18
Etapa 2: Aislamiento de los ejemplares seleccionados	20
Etapa 3: Producción de inóculo.....	22
Etapa 4: Ensayo de inoculación en pino	23
CONSIDERACIONES FINALES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
OPINIÓN DE LA ASESORA	33

INTRODUCCIÓN

La producción forestal en el Nordeste argentino (NEA) tiene gran importancia a nivel económico, concentrándose la forestación nacional en las provincias de Corrientes y Misiones (Fassola et al. 2009). Según datos del Ministerio de Trabajo de la Nación (2017), estas dos provincias elaboran el 73% de la producción forestal del país. Las principales especies cultivadas en nuestra región son Eucaliptus y Pino, habiendo también forestaciones con otras especies como Kiri y Araucaria, entre otras.

En el caso de las plantaciones forestales de Pino, presentan una relación simbiótica con hongos Basidiomicota que promueven su crecimiento, conocidas como ectomicorrizas. Estas tienen la característica de que sus micelios invaden intercelularmente la raíz de las plantas formando la red de Hartig, una estructura mediante la cual el hongo se asocia a ésta permitiéndole así el intercambio de sustancias con el árbol y aumentar la superficie explorada por las raíces a través de los micelios fúngicos (Rodríguez Pastrana et al. 2008; Myco UAL (s. f.)). La importancia ecológica de la asociación ectomicorrícica se fundamenta en que mejora la capacidad de la planta para la adquisición de nutrimentos minerales y agua del suelo, incrementa la resistencia a patógenos y favorece el mayor crecimiento de la planta; considerando que esta última es también el componente más influyente en esta relación simbiótica (Carrera Nieva y Lopez Ríos 2004; Agerer 1995a, 1995b)

Muchos de estos hongos ectomicorrícicos son inducidos a la fase reproductiva sexual cuando se dan las condiciones ambientales favorables, dando lugar a la formación del basidioma, una estructura de tejidos especializados donde se produce la cariogamia y la formación las esporas sexuales dando origen al carpóforo que se observa a simple vista en el suelo (Lechner et al. 2018; Toledo et al. 2014).

En ciertas especies, este basidioma, además de su valor como organismo simbiótico de un cultivo forestal, puede tener interés gastronómico, debido a su sabor y composición nutricional. La composición aminoacídica de los hongos comestibles es cercana a la encontrada en la proteína de la soja y, para algunas especies, puede ser análoga a la hallada en los huevos de gallina. Muchos aminoácidos esenciales que no son sintetizados por el hombre pueden obtenerse a través del consumo de hongos (Lechner et al. 2018). Aunque es necesario tener en cuenta que, en muchos casos estos pueden ser riesgosos para la salud humana y, debido a que las diferencias entre una especie y otra son poco perceptibles para el ojo no entrenado, se requiere un conocimiento previo para la identificación de cada una de estas especies.

Dentro de los géneros de hongos ectomicorrícicos que se reportan además como comestibles podemos encontrar *Laccaria*, *Lactarius* y *Suillus* entre otros (Rentería-Chávez et al. 2017; Murrieta Hernández et al. 2014; Toledo et al. 2014; Niveiro et al. 2009)

A nivel regional, Niveiro et al. (2009) han encontrado hongos de los géneros *Suillus granulatus* y *Lactarius delicious*, especies de interés gastronómico y ectomicorrícicas en cultivos de pino en Corrientes y Misiones. Es decir que la región cuenta con una potencialidad en la realización de cultivos forestales asociados a hongos ectomicorrícicos con un valor comestible y comercial.

A pesar de la importancia que tiene esta simbiosis en el correcto desarrollo del cultivo forestal, no hay muchos estudios a nivel productivo de los hongos ectomicorrícicos comestibles naturalizados respecto a variedades utilizadas en inóculos comerciales, tales como

Scleroderma spp. y *Pisolithus arhizus* utilizadas en el inoculo Simbiosis de Phol Forestal S.R.L. Esto se debe también al hecho de que no hay aislamientos de los mismos para su posterior evaluación, lo que motiva a realizar este trabajo como base para posteriores estudios de los mismos.

Por lo tanto, esta pasantía tiene como finalidad el aprendizaje y familiarización con la metodología de muestreo e identificación de las diferentes especies ectomicorrícicas, las técnicas de laboratorio requeridas para el aislamiento y la posterior producción y conservación de colonias de los hongos ectomicorrícicos de interés para su uso en las explotaciones forestales.

OBJETIVOS

- 1- Aprender las técnicas básicas para muestrear e identificar macroscópicamente hongos ectomicorrícicos comestibles asociados a *Pinus spp.*
- 2- Lograr aislamientos de los hongos a partir de muestras obtenidas en plantaciones de pinos mediante siembras y repiques en medio de cultivo
- 3- Producción de inóculos a partir de los aislados obtenidos previamente
- 4- Realizar práctica piloto de inoculación sobre plantines de pino

MATERIALES Y MÉTODOS

La pasantía se llevó a cabo en la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, ciudad de Corrientes.

Etapas 1: Recolección e identificación de hongos ectomicorrícicos

Se comenzó con la lectura bibliográfica para la recolección e identificación de los hongos asociados a las plantaciones de pino, como así también las condiciones para el mantenimiento del material para la obtención de aislamientos.

A_ Colección de hongos asociados a forestaciones implantadas en el NEA.

Para conocer la diversidad de hongos asociados a las forestaciones de Pino se realizaron salidas a campo. El muestreo se realizó en plantaciones de pino en los alrededores de Santa Ana de los Guácaras, Corrientes, durante los días otoñales y posteriores a lluvias durante el período 2019-2020. Si bien en principio se planteó la realización de muestreos en plantaciones forestales del Noreste de Corrientes y en Misiones; las restricciones en movilidad durante el período 2020 nos limitaron únicamente a las zonas cercanas.

Para el muestreo se recorrió una transecta de 50 m aproximadamente. Para ello se tomó la distancia entre un pino y otro y, en base a eso se calculó la distancia a recorrer tomando como ancho 2 metros de cada lado del lineo de árboles; en aquellas áreas donde se encontró una resiembra natural de pino se recorrió al azar observando bajo y fuera de la copa un área de 50 m² (Figura 1). Cada ejemplar que se encontró fue enumerado y fotografiado *in situ*, para que se pueda apreciar la ubicación de la seta además del ambiente, observando también si se encontraba aislado o en grupos. También se tomaron fotos *ex situ* para apreciar las características morfológicas tales como características del pie y del sombrero, presencia o no de laminillas, color de la esporada, entre otras características.

Las muestras encontradas se depositaron en cajas plásticas con su numeración correspondiente (Figura 2). De los ejemplares coleccionados, no todos eran ectomicorrícicos y comestibles, pero fueron coleccionados para ser utilizados en una pasantía que se logró realizar con el Doctor Nicolas Niveiro, biólogo especializado en micología, y referente en el área de identificación de hongos, a partir de la temática propuesta en el presente trabajo: “Técnicas de colección e identificación de macrohongos asociados a cultivos forestales del NEA”. De esta forma se adquirió una mayor experiencia en el reconocimiento de hongos, con el trabajo sinérgico de la Cátedra de Microbiología Agrícola y del Laboratorio de Micología.

Los ejemplares coleccionados se llevaron a estufa para secarlos y almacenarlos de manera óptima para su posterior análisis; los hongos ectomicorrícicos y comestibles fueron guardados en heladera para su posterior aislamiento.

Figura 1

Uno de los sitios de muestreo en Santa Ana.



Figura 2

Muestras recolectadas en caja para su traslado al laboratorio



B_ Análisis macroscópico y microscópico de los ejemplares coleccionados.

Para la identificación de los macrohongos de interés recolectados se hicieron descripciones de caracteres morfológicos de cada ejemplar (Figura 3) y, mediante el uso de claves de

identificación (Wolfgang 2013) llegar al género y, de ser posible, a la especie. Para ello se observaron las fotos obtenidas a campo y los materiales secos.

Algunos de los caracteres más relevantes observados a nivel macroscópico son:

- Material sobre el cual se encontraron los ejemplares, además de las especies forestales encontradas en los alrededores de los mismos
- Presencia de volva, anillo y forma del pie
- Consistencia de la carne
- Características de laminillas y color de la esporada
- Características del píleo
- Coloración

A nivel microscópico, se realizaron -bajo microscopio estereoscópico Modelo Leica Ez4 y con una hoja de afeitar- cortes transversales a nivel del píleo lo más delgados posibles. Es de destacar que al principio se utilizó bisturí, pero los cortes no resultaban muy delgados, lo que dificultaba la observación; los cortes con hoja de afeitar tuvieron una etapa de entrenamiento para la preparación de los ensayos, ya que no resultaba fácil manejar el pulso y lograr obtener cortes tan delgados para visualizar los diferentes componentes.

Estos cortes se montaron sobre portaobjetos y, para facilitar la observación, se realizaron dos formas de tinción utilizando dos colorantes: Reactivo de Melzer por un lado, e hidróxido de sodio con floxina por otro.

Una vez hechos los preparados, se los observó en el microscopio (Modelo del microscopio Leica DM 500):

- Presencia de cistidios
- Presencia y color de las basidioesporas
- Basidios
- Esporas

Figura 3

Partes macroscópicas de los carpóforos, imagen ilustrativa.



Nota: Imagen obtenida de: www.avelinasetas.info

Etapas 2: Aislamiento de los ejemplares seleccionados

El medio de cultivo seleccionado para realizar los aislamientos fue Agar papa glucosado (APG) en base a los resultados obtenidos en los estudios de Murrieta Hernández et al. (2014).

Para la preparación de los mismos se colocó 200 ml de agua destilada en un erlenmeyer y se precalentó a una temperatura de 60°C aproximadamente; luego se agregó 7,8 g de APG (marca comercial Britania), según la concentración indicada en el marbete del medio de cultivo. Esta mezcla se llevó a ebullición hasta homogeneizar la solución, denotándose por la pérdida de opacidad de la misma. Una vez hecho esto, se le colocó un tapón de algodón y gasa, y se llevó a autoclave por 20 minutos a 1,5 atmósferas de sobrepresión.

Una vez finalizado el autoclavado, y luego de que la autoclave baje la presión, se retiró el erlenmeyer y se llevó a la cámara de flujo laminar para distribuir en placas de Petri en forma aséptica. De estos 200 ml de medio se obtienen entre 10 y 12 placas, dependiendo del tamaño de las mismas (Figura 4).

Para los aislamientos se utilizaron zonas del carpóforo que no estaban en contacto con el exterior y no presentaban síntomas de contaminación (larvas u hongos), los cuales fueron seleccionados en base a las características fenotípicas de las setas, tales como coloración de la esporada, expansión del sombrero, textura al tacto, entre otras, eligiendo en base a esto las setas maduras sin signos de deterioro para los aislamientos. Se los aislaba preferentemente dentro de los 3 días después de la recolección ya que debido a su alto contenido de humedad presentan un rápido deterioro, a pesar de estar conservados en heladera.

Se utilizaron cortes de la parte central del himenóforo, zona que se encuentra inmediatamente por encima del himenio, previa limpieza del mismo despegando la cutícula superior con cuidado de no dejar fragmentos, ya que debido a su consistencia viscosa puede tener adheridos posibles contaminantes; posteriormente se removió el estípote y el píleo. Una vez completada esta limpieza se procede a cortar a la mitad el himenóforo y de esta sección interna con un bisturí previamente desinfectado se vuelve a retirar una fina capa y por debajo

de la misma se retira un segmento del tejido del carpóforo. Estos segmentos cortados serán sembrados en medio de cultivo (Honrubia et al. 1995).

En cada siembra se hacían 3 repeticiones por muestra en caso de que hubiera problemas por contaminación, aunque en la mayoría de los casos se obtuvieron aislamientos sin presencia de contaminantes en todas las repeticiones. Las placas sembradas fueron llevadas a estufa de crecimiento a 24°C por 30 días. De los crecimientos obtenidos se realizaron repiques sucesivos en placas de APG.

Una vez realizada la purificación de los crecimientos se generó un stock de aislados, de los cuales uno se conservó en heladera como parte del cepario y los otros fueron colocados en heladera como material de trabajo con los cuales se harían los repiques para las diferentes pruebas que se necesiten o se planifiquen, tales como pruebas con fungicidas, velocidad de crecimiento, desarrollo en diferentes medios de cultivo, entre otros.

Dentro de lo que implica el mantenimiento de las cepas fúngicas, se decidió probar una técnica de conservación en tubos con agua destilada estéril donde son colocadas tiras de papel de filtro con micelio. Para ello, se colocaron tiras de papel esterilizadas sobre placas de APG, donde luego se realizó la siembra de tacos de micelio y se incubaron a una temperatura de 24°C. Cuando las tiras de papel se cubrieron de micelio (aproximadamente a los 30 días) se las guardaron en los tubos con agua estéril a 5°C (López Alcalá et al. 2012).

Una vez obtenidos materiales para la conservación de los hongos de interés recolectados, se procedió a relevar todos los datos en planillas de Excel para así obtener un registro de hongos según el sitio de recolección. Esto ayudaría a reconocer si cada zona de muestreo presentaba diferencias respecto a los macrohongos presentes.

Los datos relevados en el Excel fueron:

- Denominación
- Nombre científico del espécimen
- Hábito de vida del hongo
- Lugar y fecha de recolección
- Medio de conservación
- N° de aislamientos

Figura 4

lq. plaqueo de medios; der. material fúngico sembrado.



Etap 3: Producción de inóculo

En el caso de la producción de inóculo miceliar para las posteriores pruebas de inoculación sobre pinos se optó por un medio líquido por la facilidad que este representa en la aplicación al sustrato o semilla.

En base a los estudios de Murrieta Hernández et al. (2014) se preparó el medio BAF (biotina, ácido fólico, agar), el cual está compuesto de:

Glucosa 30.0 g
Peptona 2.0 g
Extracto de levadura 0.2 g
 KH_2PO_4 0.5 g
 $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0.5 g
 $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 10.0 mg
 $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1.0 mg
 MnSO_4 5.0 mg
 $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 100.0 mg
Tiamina HCl 50.0 μg
Biotina 1.0 μg
Ácido fólico 100.0 μg
Inositol 50.0 μg
Agar 15.0 g
Agua destilada 1000.0 ml

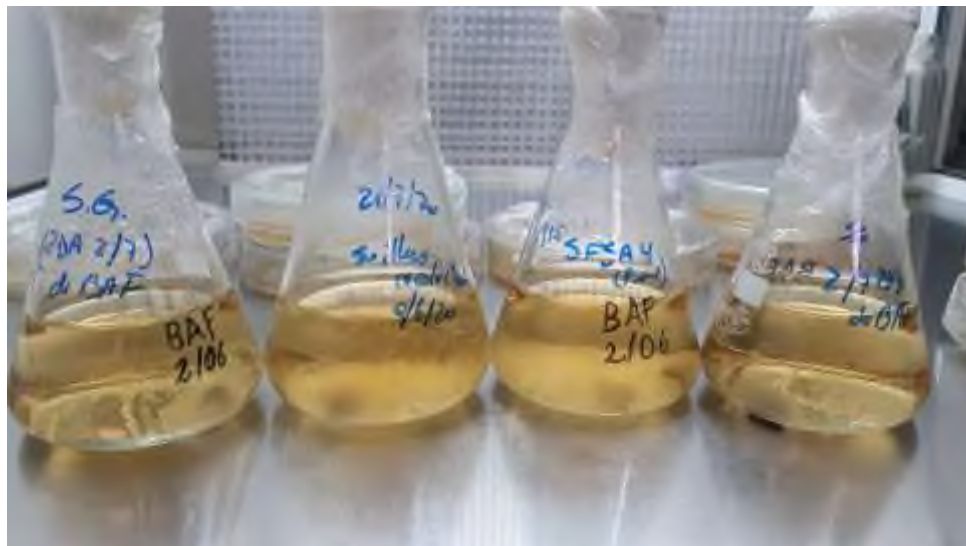
Sin embargo, debido a la dificultad de obtener algunos insumos durante el año 2020, se preparó sin los componentes de biotina, ácido fólico y tiamina, evaluando la presencia de crecimiento; el cual se dio sin aparentes inconvenientes. Para cada inóculo se prepararon erlenmeyers de 200 ml con 150 ml del medio de cultivo, a los cuales se inocularon tacos de APG con micelio, obtenidos con un tip de micropipeta (7 mm de diámetro) (Figura 5).

También, siguiendo con lo recomendado por la bibliografía como la técnica de inoculación más utilizada a fines prácticos (Nouhra y Becerra, 2011), se preparó un inóculo esporal, para el cual se tomaron carpóforos frescos, se le retiró el pie y la cutícula al himenio y se los licuó con agua destilada durante 2-3 minutos. La suspensión obtenida se filtró a través de un colador con una

gasa para retirar el máximo posible del sobrante orgánico y reducir la formación de colonias bacterianas y fúngicas indeseadas en la misma. Este preparado se almacenó en heladera a 4°C, teniendo una vida útil de 3 a 6 meses (Smith y Kolkowski, 1996).

Figura 5

Erlenmeyers con medio de cultivo BAF recién sembrados con tacos de micelio.



Etapa 4: Ensayo de inoculación en pino

Para la prueba piloto de inoculación, se planteó un ensayo en plantines de pino a partir de semillas. Los tratamientos que se evaluaron fueron con los aislamientos obtenidos y se sumó un inóculo comercial adquirido de Paul Forestal, denominado Simbiosis®, conteniendo inóculo esporal y micelial de *Scleroderma spp.* y *Pisolithus arhizus* a una concentración de 100.000 unidades colonizadoras por litro de inóculo.

De esta manera los tratamientos realizados fueron:

- A- Inóculo comercial (Simbiosis®)
- B- Inóculo micelial de *S. granulatus*
- D- Inóculo micelial de *S. flavidus*
- E- Testigo, sin inoculación ectomicorrícica

La distribución de los tratamientos fue en 5 bandejas de 36 pocillos de 75 cm³, aplicando un tratamiento por bandeja; la quinta bandeja fue dividida en 4 partes aplicando los 4 tratamientos realizados.

Preparación de sustrato

Se utilizó un sustrato elaborado con turba, corteza de pino compostada y lombricompuesto en una proporción 13:6:1 respectivamente. El aporte de nutrientes se realizó únicamente a través del lombricompuesto sin realizar fertilizaciones, con la idea de probar las ventajas de la micorrización.

A la turba y a la cáscara de pino compostada se le determinó pH colorimétricamente mediante el reactivo BTA (bromotimol azul) y cuantitativamente con un pHmetro. Además, se determinó

colorimétricamente la presencia de NH_4 mediante el reactivo de Nessler y de NO_3 mediante el uso de dos reactivos, Griess A y Griess B con Zn. Estas mismas pruebas se aplicaron al sustrato una vez elaborado.

El lombricompost fue enviado para su análisis al Instituto Agrotécnico “Pedro M. Fuentes Godo” de la ciudad de Resistencia-Chaco (Figura 6).

En el caso de la turba se determinó que su pH era de 5,6 mediante el reactivo BTA (bromotimol azul) y 5,4 con el pHmetro. Este material no presentó NH_4 y NO_3 .

En cuanto a la cáscara de pino compostada tenía un pH de 4,5 mediante el reactivo BTA y 5,5 con el pHmetro. Este material presentó elevado contenido de NO_3 y cierto contenido de NH_4 .

Una vez armado el sustrato arrojó unos valores de pH de 4,5 mediante el reactivo BTA y 5 con el pHmetro. En cuanto a la presencia de nitrógeno este, al igual que la turba, presentó contenidos de NH_4 y NO_3 (Figura 7).

Figura 6

Tabla con los valores del lombricompost

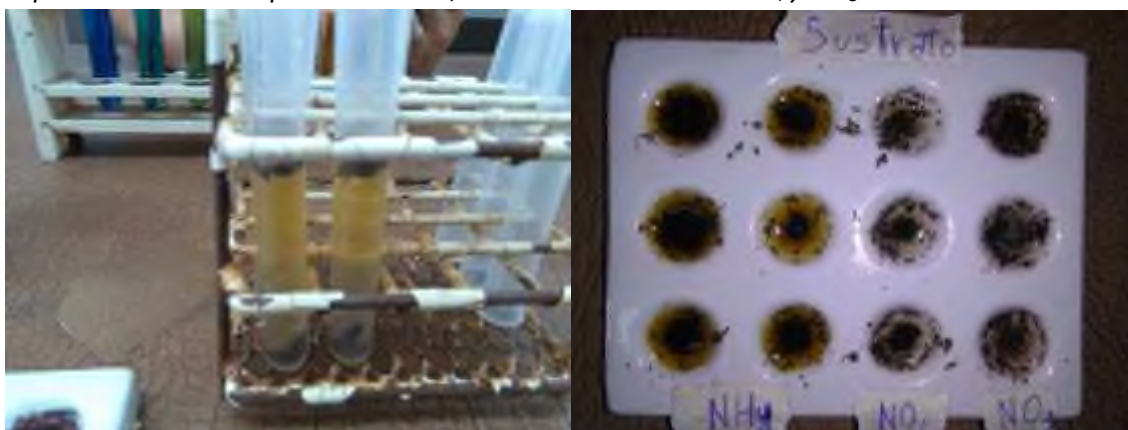
	Ph	C.E	Hu	S.T.	M.O.	N.T.	P	Mg	K	Ca	NO3
		dS.m-1	%	%	%	%	%	%	%	%	Ppm
LC	7,0	1,2	6,0	94,0	33,7	0,63	0,30	1,6	0,4	4,2	393

El sustrato preparado fue autoclavado por dos ciclos distanciados en un mínimo de 24 hs. Para ello las bolsas con sustrato fueron humedecidas y llevadas a autoclave a 1.5 atm por 20 minutos. A pesar de realizar esta operación, no se obtuvieron buenos resultados, ya que al cabo de unos días el sustrato esterilizado en bolsas se encontraba completamente cubierto de hongos con esporas amarillentas; observando además que aquellas bolsas que no habían pasado por autoclave pero que estaban humedecidas no presentaban crecimiento alguno. En base a esto, se optó por el uso del fungicida Carbendazim para el control de posibles enfermedades presentes en el sustrato. Las aplicaciones se hicieron al momento de la siembra (no siendo esta una aplicación óptima al tratarse de un fungicida sistémico) y dos semanas después cuando ya el cultivo enraizó. Para la aplicación de los tratamientos a los plantines se esperó al menos un mes desde la aplicación del producto.

Los contenedores elegidos para colocar el sustrato y realizar la siembra fueron bandejas con tubetes de 75 cm³. Estas se desinfectaron mediante una inmersión en una solución de lavandina al 10% por 15 minutos; una vez cumplido este período se las enjuagó con agua corriente, se las dejó secar y se las embolsó hasta el momento de la siembra.

Figura 7

Izq. Determinación de pH del sustrato; der. Determinación de NH_4 y NO_3



Estratificación de semillas y siembra

Los plantines de pino se obtuvieron a partir de semillas de *Pinus taeda* gentilmente donadas por EEA INTA Montecarlo-Misiones, las cuales venían con la prueba de Poder Germinativo que arrojaba un valor del 80%.

Previo a la siembra, se aplicó un proceso de estratificación a las semillas con el objetivo de generar las condiciones naturales que las semillas deben experimentar antes de que pueda ocurrir la germinación y así homogeneizar la emergencia de los plantines.

Para ello primero se aplicó el test de flotabilidad a las semillas, dejándolas en agua estéril por 24 horas a temperatura ambiente y cumplido este período se descartaron las que flotaban, consideradas como vanas. Luego se las llevó a heladera a 4°C por un período de 45 días.

Una vez completado este proceso se desinfectaron las semillas con hipoclorito de sodio al 1,5% por 30 minutos, se las lavó 3 veces con agua estéril y por último se les aplicó 3 lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada.

Para la preparación del hipoclorito de sodio al 1,5 % se utilizó lavandina comercial, la cual viene al 5,6% y se usó la formula $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ (C: concentración; V: volumen) para diluirla.

Una vez hecho esto se sembraron 42 semillas por tratamiento y junto con la siembra se realizó una primera aplicación del fungicida preventivo Carbendazim. Luego los tubetes fueron trasladados a Santa Ana de los Guácaras, Corrientes; lugar en el cual se realizó el seguimiento de los mismos (Figura 8).

Seguimiento del ensayo

A los 7 días de la siembra las semillas comenzaron a germinar y a los 60 días se aplicaron los tratamientos. Para ello se enumeró cada bandeja y se aleatorizó aplicando un tratamiento por bandeja; en la quinta bandeja los tratamientos fueron aplicados en bloques, quedando con los 4 tratamientos distribuidos en ella. Al momento de la inoculación se contaba con 34 individuos por tratamiento, pero que por diferentes factores (PG, enfermedades, estrés) al final del experimento se llegó con 15 individuos en promedio por tratamiento.

Una vez emergidos los plantines se procedió a medir mensualmente la altura de los mismos con una regla desde el cuello hasta donde se podía observar el ápice de la planta y anotando si se presentaba alguna anomalía observable a simple vista (Figuras 8, 11 y 12).

Para la preparación del inóculo con el micelio producido en medio BAF se tomaron los 150 ml del medio cubierto en micelio, se le retiró el sobrante del medio de cultivo mediante un colador y, al micelio obtenido se le agregó un volumen de 500 ml de agua y se lo licuó con una minipimer (Figura 9). La inoculación se realizó en dos momentos, la primera a los dos meses de la siembra y la segunda al mes de realizada la inoculación anterior (Figura 10).

El ensayo se empezó bajo media-sombra del 80% y realizando un riego por aspersión una vez al día, cambiando la frecuencia a una vez cada tres días a los seis meses, con un sombreado únicamente en las horas de máxima insolación. Al cabo de 8 meses se las llevó a sol pleno y se les redujo otra vez el riego a una vez por semana.

A los 10 meses, al momento de finalizar el experimento, se midió el diámetro a la altura del cuello y la altura de las plantas y se determinaron los índices de robustez y de calidad de Dickson de cada tratamiento.

Para evidenciar la micorrización, las plantas fueron extraídas del tubete, observando si en el pan de raíces y sustrato se visualizaban micelios y raíces cortas con manto fúngico.

De los plantines en los que se pudo observar una buena micorrización a simple vista, se tomaron fragmentos de estas raíces, se las cortaron y se observaron bajo la lupa. Luego se realizaron delgados cortes transversales y se observaron bajo el microscopio para apreciar las características de las estructuras formadas; para ello se tiñeron los cortes con azul de metileno.

Para la obtención de peso fresco y seco de las plantas, se extrajeron 5 individuos al azar por tratamiento, se lavaron las raíces bajo agua del grifo y cuidadosamente se fueron removiendo los residuos de sustrato adheridos a las mismas. Una vez hecho esto se secaron los plantines con servilletas y se obtuvo el peso fresco (PF) de cada individuo (Figura 13).

Finalizadas estas mediciones, se colocó cada individuo en bolsas de papel enumeradas y se las llevó a estufa a 105 °C hasta peso constante. Luego se determinó el peso seco de copa (PSC) y peso seco de raíz (PSR) por separado cortando los plantines a la altura del cuello. Esto se realizó así para después determinar el Índice de Dickson de cada tratamiento con estos valores.

Figura 8

Izq. Siembra de las semillas de pino; der. Inicio de las mediciones de los pinos



Figura 9

Izq. Preparación del inoculo miceliar; der. Inoculo miceliar preparado



Figura 10

Inoculación de los plantines con micelio



Figura 11

Izq. pl. del tratamiento B a los 6 meses de sembrado; der. pl. del tratamiento D a los 6 meses de sembrado

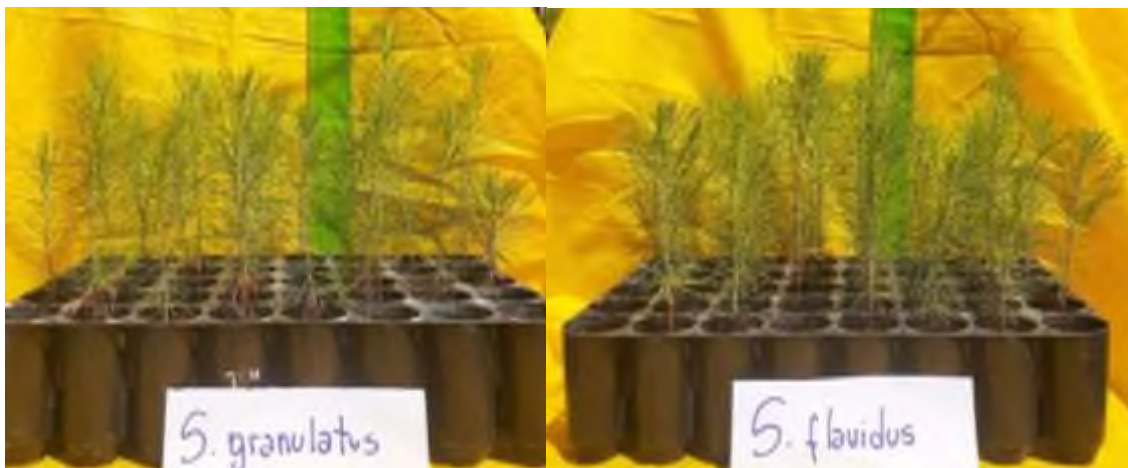


Figura 12

Izq. pl. del tratamiento A a los 6 meses de sembrado; der. pl. del tratamiento E a los 6 meses de sembrado



Figura 13

Izq. Lavado de raíces para determinación de peso; der. Determinación de p. fresco de los plantines



RESULTADOS

Etapa 1: Recolección e identificación de hongos ectomicorrícicos

Durante la etapa de muestreo se lograron recolectar varias especies ectomicorrícicas de interés, encontrándose *Suillus granulatus* y *S. flavidus*, *Russula amoenolens* y *Pisolithus arhizus*; con predominancia de *Suillus flavidus* frente a las demás especies (Figuras 14, 15 y 16).

A partir del análisis macroscópico se eligió a *S. flavidus* y *S. granulatus* para su aislamiento, ya que además de su interés ectomicorrícico presentan valor gastronómico, dando un valor agregado a la producción forestal (Moser 1978; Raithelhuber 2004; Niveiro 2013; Niveiro et al. 2014) (Figuras 3 y 4).

Suillus flavidus se reconoció por: Esporas sin conectores clamps ovaladas. Presencia de puntos glandulares y anillo. Poros de más de 1 mm de ancho en ejemplares adultos. Píleo viscoso, amarillo bronceado a oliva-grisáceo los ejemplares adultos. Estípite amarillo con puntuaciones oliváceas (Figura 17) (Wolfgang Klofac, 2013).

Suillus granulatus se reconoce por: Esporas ovaladas sin conectores clamp. Presencia de puntuaciones glandulares y ausencia de velo y anillo. Píleo beige con superficie viscosa con himenio amarillo pálido. Estípite amarillo pálido con granulaciones amarillas en la parte superior lo que le da el nombre a la especie. Este se torna castaño claro en la base (Figura 18) (Wolfgang Klofac, 2013).

Figura 14

Izg. S. flavidus; der. recolección de fotografías para análisis.



Figura 15

Izq. S. granulatus; der. R. amoenolens



Figura 16

P. arhizus



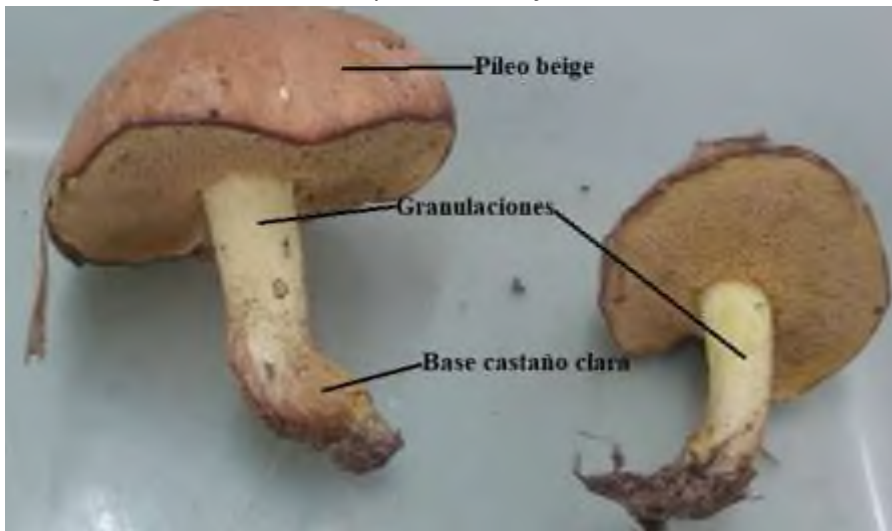
Figura 17

Izq. partes de S. flavidus usadas para su identificación; der. Esporas vistas al microscopio



Figura 18

Partes de S. granulatus usadas para su identificación



Análisis microscópico

Luego de realizados los cortes del material y el montaje sobre el portaobjeto (Figuras 19 y 20) se observaron algunas características de estos hongos. Como puede apreciarse en la figura 21, se visualizaron los cistidios, los cuales son unas células especiales de gran tamaño que se encuentran en el himenio de los basidiomicetes y se consideran una característica micromorfológica útil en la identificación, ya que tienen formas muy variadas y suelen ser únicas para cada especie o género. También se observaron los basidios que suelen presentar

una forma característica y son la estructura que soporta a las basidioesporas, que son las esporas sexuales producidos por éstos. Estas también presentan forma, tamaño y colores característicos que son útiles para la identificación de las especies de hongos.

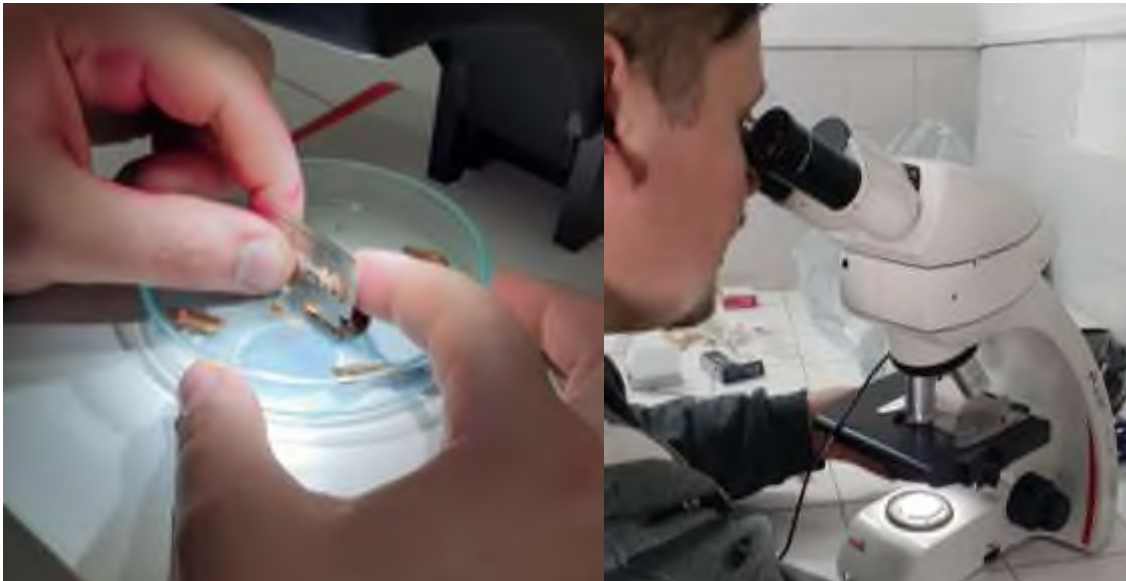
Figura 19

Izq. Suillus recolectados a observar; der. Preparación del material bajo la lupa



Figura 20

Izq. Realización de cortes del himenio; der. observación del material en el microscopio



Nota: Luego de haber realizado los cortes del himenio del hongo estos fueron teñidos con los colorantes antes mencionados y montados en un portaobjeto para su observación.

Figura 21

Estructuras observadas al microscopio



Etapa 2: Aislamiento de los ejemplares seleccionados

Se observó que ambas especies iniciaron su crecimiento lentamente a los 7 días de su siembra, a una temperatura de 24°C en oscuridad en los medios testeados (Figura 22).

Figura 22

Crecimientos a las 2 semanas de la siembra.



Los aislamientos obtenidos fueron caracterizados según su forma de crecimiento, observando tanto la cara superior de la placa como el envés de la misma (Figura 23). En el caso de los crecimientos de *S. flavidus* las colonias presentaban un crecimiento algodonoso muy denso de color blanco brillante levemente amarillento, que en estadios avanzados mostraban exudaciones ocreas en su superficie.

En el envés presenta una coloración naranja amarillenta, siendo naranja-oscuro en el centro y aclarándose hacia los bordes.

Una vez obtenidos los aislamientos puros, se registraron sus datos en la tabla 1.

Figura 23

Izq. Parte superior del crecimiento de S. flavidus; der. Parte inferior los mismos crecimientos



Tabla 1

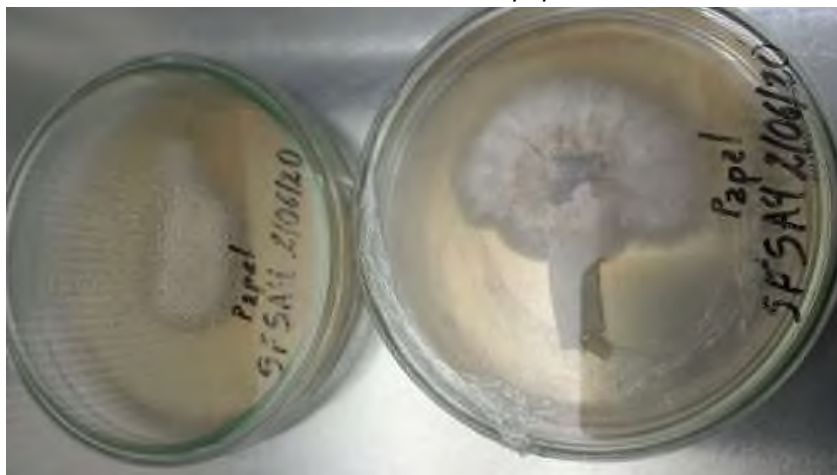
Cepario con los datos registrados

Denominación	Género y sp.	Función	Origen	Procedencia	Fecha	Medio
SF SA 1	Suillus flavidus 1	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Santa Ana, Ctes	4/06/19	PDA
SF SA 2	Suillus flavidus 2	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Santa Ana, Ctes	4/06/19	PDA y papel
SF SA 4	Suillus flavidus 3	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Santa Ana, Ctes	13/08/19	PDA
SG SA 5	Suillus granulatus 1	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Santa Ana, Ctes	13/08/19	PDA y papel
SG SA 6	Suillus granulatus 2	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Santa Ana, Ctes	13/08/19	PDA
SF SA 9	Suillus flavidus 4	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Santa Ana, Ctes	9/06/20	PDA
SF LS 11	Suillus flavidus	Ectomicorrícico	Suelo pinal	Laguna Soto, Ctes	11/06/20	PDA

En cuanto a la técnica de conservación evaluada, se obtuvo que los materiales conservados sobre papel en agua estéril a 5°C retomaban más rápido el crecimiento que los conservados únicamente sobre PDA en heladera; interpretamos que esto se debe a que en este caso el micelio tiene mejor contacto con el medio fresco en el cual se siembra facilitando que retomen sus procesos biológicos. Esta técnica adquiere interés para conservar material de trabajo en el cepario, ya que los materiales estarán fácilmente disponibles para ensayos posteriores (Figura 24).

Figura 24

Crecimientos miceliales conservados sobre papel.



Se intentó además hacer aislamientos de *Pisolithus arhizus* pero en todos los intentos no se tuvieron buenos resultados. Esto se debió quizás a la estructura característica de los hongos pertenecientes a la familia Sclerodermataceae, en el cual no era factible aplicar la misma metodología de aislamiento usada para los otros ejemplares de la familia Suillaceae. Ante el hecho de que sus setas no tienen un valor gastronómico aprovechable por productores no se trató de ajustar su técnica de aislamiento.

Etapas 3: Producción de inóculo

El ensayo de obtención de inóculo micelial en medio líquido (BAF) de estas dos especies resultó satisfactorio, obteniendo un crecimiento completo en el medio a los 65 días (Figura 25). Este período nos permite planificar el momento en que tendremos que elaborar el inóculo para tenerlo preparado al momento que queramos realizar nuestros plantines de pino.

El inóculo esporal a pesar de haber sido filtrado y almacenado en heladera, presentó una coloración opaca diferente a la original y un aroma desagradable. Por ello se realizó una siembra en APG y se obtuvieron abundantes crecimientos de colonias de bacterias y se decidió descartar la posibilidad de incluir un tratamiento que contemplara el uso de esporas en este ensayo.

Figura 25

Medios BAF previos a la inoculación.



Etapa 4: Ensayo de inoculación en pino

Desde la germinación hasta el momento de extracción, se produjo una importante reducción en el stand de plantas. Al inicio fue bajo y se produjo principalmente por damping-off, aunque algunos también sufrieron daños mecánicos durante una tormenta. Luego se produjo otra pérdida de individuos debido al estrés producido al pasar los plantines a sol pleno, en el cual algunos mostraron un marchitamiento y otros una necrosis en el ápice. Las últimas mediciones se realizaron a los 10 meses, contando cada tratamiento con 15 individuos.

Una vez finalizada la etapa de vivero, se realizó una evaluación a simple vista de la micorrización en el pan de sustrato y raíces (Figura 26), y se contabilizó en cada tratamiento el porcentaje de micorrización:

- Inóculo Comercial: 7 % de micorrización
- *Suillus granulatus*: 7 % de micorrización
- *Suillus flavidus*: 20 % de micorrización
- Testigo: 0 % de micorrización

De los pocos individuos que se pudieron observar bajo la lupa, se visualizaron raíces terciarias cortas bi a trifurcadas con un recubrimiento micelial algodonoso color ocre pálido compacto con micelios que no se extendían más de 1 mm desde las raíces (Figura 27).

En base a la bibliografía (Agerer 1995a, 1995b, García Rodríguez 2018) para poder observar correctamente la red de Hartig es necesario realizar un preparado especial y contar con un microscopio confocal del cual no se dispone en el laboratorio. Igualmente, y a modo de práctica, se realizaron cortes longitudinales de las raíces y se observaron al microscopio óptico (Figura 28).

Figura 26

Plantines al final del experimento



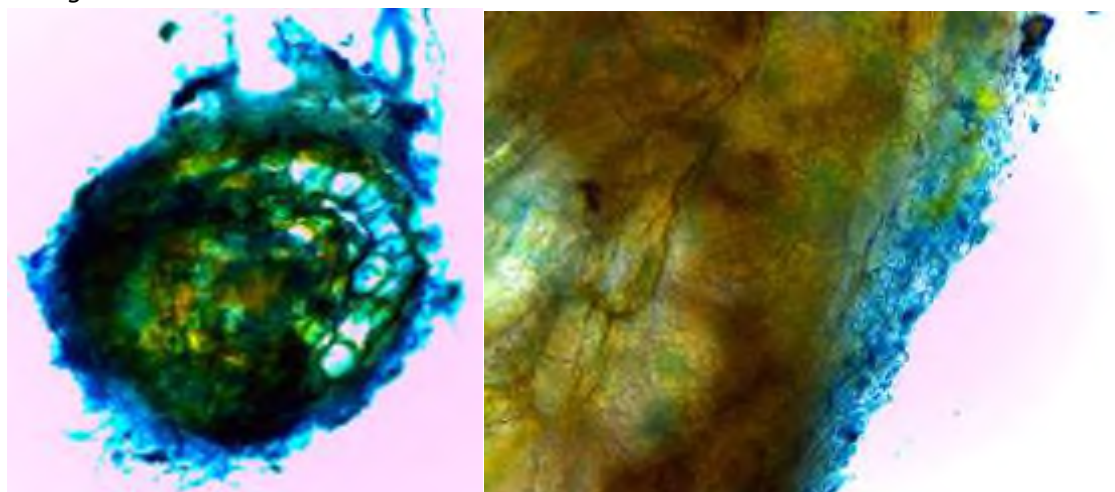
Figura 27

Izq. Plantin con las raíces micorrizadas con S. flavidus; der. Observación bajo la lupa de las mismas raíces



Figura 28

Izq. Corte transversal de raíz micorrizada; der. Acercamiento a células para apreciar la red de Hartig



Con los valores obtenidos de las mediciones finales al momento de extracción de las plantas se elaboró una tabla con las medidas de resumen obtenidas de cada variable (Tabla 2). Lo que se puede observar en estos resultados es que la mayoría de los coeficientes de variación de cada tratamiento y variable medida fue inferior o estuvo alrededor de 25.

Tabla 2

Medidas de resumen de las variables atendidas en el ensayo de inoculación.

TRATAMIENTOS	Variable	n	Media	CV
A	ALT FINAL mm	15	166,93	12,89
B	ALT FINAL mm	15	158,47	22,35
D	ALT FINAL mm	15	158,07	16,23
E	ALT FINAL mm	15	179,07	10,86
A	DAC MM	15	2,12	15,74
B	DAC MM	15	2,67	18,62
D	DAC MM	15	2,34	25,10
E	DAC MM	15	2,12	14,54
A	PF g	5	2,99	25,07
B	PF g	5	3,29	11,62
D	PF g	5	2,69	22,15
E	PF g	5	2,62	9,88
A	PS P.A. g	5	0,45	25,72
B	PS P.A. g	5	0,46	16,34
D	PS P.A. g	5	0,42	16,54
E	PS P.A. g	5	0,37	16,55
A	PS R. g	5	0,78	23,41
B	PS R. g	5	0,92	9,84
D	PS R. g	5	0,73	17,82
E	PS R. g	5	0,71	8,91

Nota: Se muestran los valores promedio de las mediciones de altura final (ALT FINAL); diámetro a la altura del cuello (DAC); peso fresco (PF); peso seco de la parte aérea (PS P. A.) y peso seco de la raíz (PS R.) tomadas de cada tratamiento. A (i. comercial); B (*S. granulatus*); D (*S. flavidus*); E (testigo)

Una vez ordenados todos estos valores, se hizo el análisis de la varianza para saber si los resultados presentaban diferencias significativas (Tabla 3). Aquí se observó que dentro de cada variable los coeficientes de variación también fueron bajos, y en base al p-valor se pudo apreciar que sólo el diámetro a la altura del cuello presentó diferencias significativas. Por lo cual se aplicó la comparación de medias por el test de Tukey a esta variable, para determinar cuál de los tratamientos obtuvo mejor resultado (Tabla 4). Mediante este análisis se pudo apreciar que el tratamiento B (*S. granulatus*) presentó diámetros superiores al tratamiento E (testigo) y A (i. comercial), mientras que el tratamiento D (*S. flavidus*) no presentó diferencias significativas con ningún tratamiento.

Tabla 3

Análisis de la varianza de las variables estudiadas

Variable	p-valor	Coeficiente de variación
Altura	0,1090	15,84
Diámetro a la altura del cuello	0,0039*	19,32
Peso fresco	0,2101	18,34
Peso seco parte aérea	0,3748	19,56
Peso seco sist. Radical	0,0713	15,93

Nota: *Este p- valor fue menor al nivel de significancia 0,05 por lo tanto presentó resultados estadísticamente diferentes.

Tabla 4

Test de Tukey de los diámetros a la altura del cuello promedio de cada tratamiento

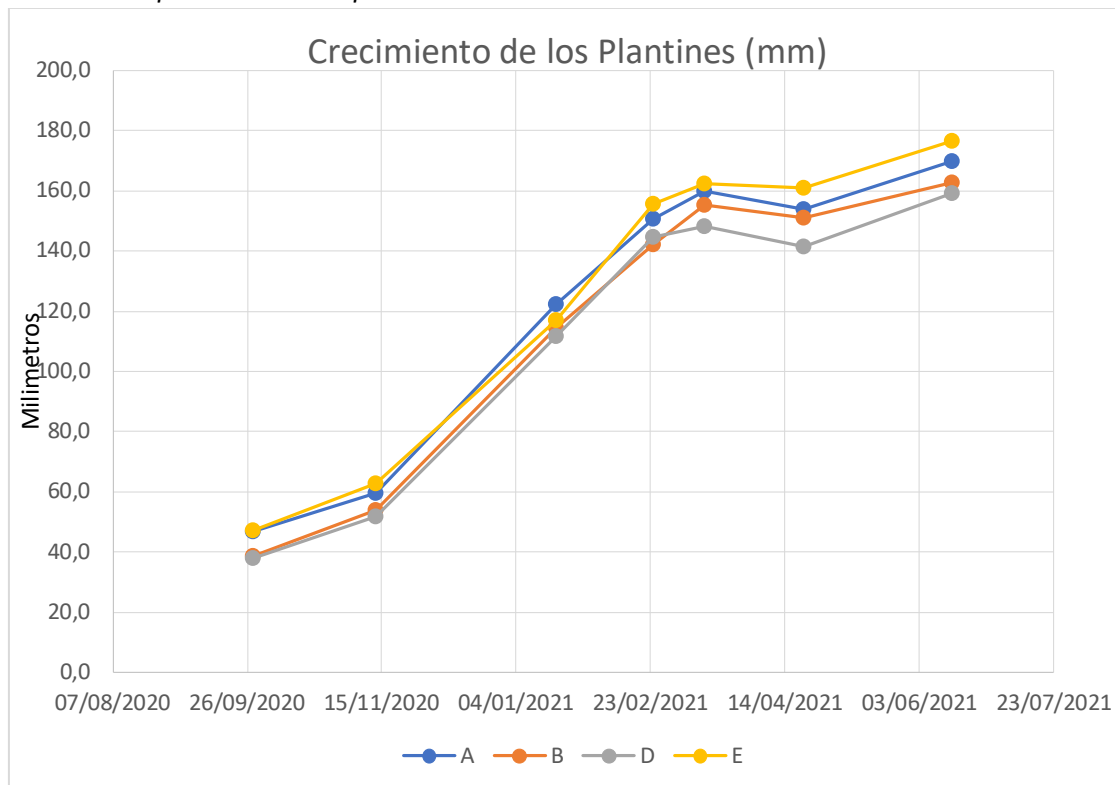
TRATAMIENTO	Medias	n	
B	2,67	15	A
D	2,34	15	A B
E	2,12	15	B
A	2,12	15	B

A partir de la variable altura se obtuvo un promedio de las mediciones de cada fecha y se elaboró un gráfico con los promedios de cada tratamiento (Figura 29) en el cual se puede observar que el tratamiento A (i. comercial) y E (testigo) iniciaron con alturas superiores al tratamiento B (*S. granulatus*) y D (*S. flavidus*); manteniéndose esta relación hasta los 6 meses. Luego de esto, los plantines entraron a la etapa de rustificación donde se les redujo su sombreado y riego, lo que generó que los plantines disminuyeran su velocidad de crecimiento con excepción del tratamiento B; y cuando se les retiró completamente la media sombra se notó una detención del crecimiento en altura en la medición del mes siguiente. Los tratamientos D y A mostraron una reducción en la altura promedio, lo que pudo deberse al estrés producido en ese período y también a la pérdida de turgencia del plantin (Prieto Ruiz et al. 2004).

Luego de esta etapa de adaptación al cambio a pleno sol, los plantines retomaron el crecimiento. Al final del experimento el tratamiento E fue el que obtuvo una altura promedio superior, seguido del A. Por último, estaban los tratamientos B y D con valores cercanos. Se logró que los dos tratamientos más afectados (D y A) retomen un ritmo de crecimiento similar a los demás luego de la disminución en el período de cambio sombra-pleno sol.

Figura 29

Crecimiento promedio de los plantines en cada tratamiento.



Nota: A: inóculo comercial; B: *Suillus granulatus*; D: *Suillus flavidus*; E: testigo

Luego las variables medidas se utilizaron para obtener dos índices que sirven para determinar la calidad del plantín:

- Índice de robustez (IR): Es la relación entre la altura de la planta (cm) y el diámetro del cuello de la raíz (mm); es un indicador de la resistencia de la planta a la desecación por el viento, de la supervivencia y del crecimiento potencial en sitios secos. Su valor debe ser menor a 6. Un valor inferior indica una mejor calidad de la planta, arbolitos más robustos, bajos y gruesos más aptos para sitios con limitación de humedad; valores superiores a 6 sugieren una desproporción entre el crecimiento en altura y el diámetro describen ejemplares más vulnerables a daños por viento, sequía y heladas (Sáenz Reyes *et al.* 2014).
- Índice de calidad de Dickson (ICD): Este índice permite evaluar mejor las diferencias morfológicas entre plantas de una muestra. Es el mejor parámetro para indicar la calidad de planta, ya que expresa el equilibrio de la distribución de la masa y la robustez, lo que evita seleccionar plantas desproporcionadas y descartar ejemplares de menor altura, pero con mayor vigor (García, 2007). Este índice toma valores entre 1 y 0,00 considerándose como buenos plantines aquellos con ICD mayores a 0,5; aceptables entre 0,49- y 0,2 y como plantines de mala calidad cuando tienen valores menores a 0,2.

$$IR = \frac{\text{Altura de la parte aérea (cm)}}{\text{Diámetro de tallo (mm)}}$$

$$ICD = \frac{\text{Masa seca total (g)}}{\frac{\text{Altura tallo (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Masa seca aérea (g)}}{\text{Masa seca raíz (g)}}}$$

Mediante los resultados obtenidos (Tabla 5) se pudo interpretar que en base al índice de robustez basándonos en los valores sugeridos por Sáenz Reyes *et al.* (2014) el único tratamiento que presentó unos plantines con una calidad aceptable fue el tratamiento B, que son los plantines inoculados con *S. granulatus*. En cambio, si este índice se compara con uno ajustado para *Pinus taeda* (Luna, 2019) en el cual se toma como aceptables plantines con valores de este índice entre 5,4 y 8,1, el único tratamiento con plantines de mala calidad fue el tratamiento E. En este caso hay que hacer la salvedad de que este rango es para plantines de 6 meses. Según los rangos obtenidos por Carneiro (1976) los diámetros y alturas del presente trabajo están muy por debajo de los valores que en promedio tendrían que tener plantas cercanas a los 15 meses, ajustándose más a los rangos que Carneiro estableció para plantas con 8 meses de edad.

En cuanto al índice de calidad de Dickson, se puede apreciar que ninguno de los plantines en promedio alcanzó una calidad aceptable dentro del mismo, aunque el tratamiento B sigue siendo el que obtuvo mejores resultados. Esto se debe a que el índice de calidad de Dickson puede ser más estricto ya que incorpora otra variable como lo es la biomasa seca.

Tabla 5

Valores de IR y ICD de cada tratamiento

Tratamiento	Índice de Robustez (IR)	Índice de calidad de Dickson (ICD)
A	8	0,121
B	6	0,155
D	7	0,134
E	9	0,099

CONSIDERACIONES FINALES

A través de este trabajo, se pudo comprobar que hay un importante banco de especies fúngicas ectomicorrícicas en la región noreste de Corrientes. Ya que se asume que estos hongos son originarios de la misma región que los árboles a los que se asocian, se puede concluir que todas estas especies fueron introducidas en algún momento a la zona de manera inintencional junto con las pináceas cultivadas, ya que no hay registros de planes de micorrización previos en la provincia. Además, se pudo comprobar la presencia de hongos ectomicorrícicos comestibles, posibilitando un ingreso extra para los productores forestales de nuestra región, quienes podrían conducir sosteniblemente este recurso sin gran inversión extra; con el único requisito de adquirir los conocimientos para la identificación correcta de estos hongos.

Una vez identificados las especies y siguiendo las metodologías citadas en bibliografía fue posible aislar satisfactoriamente las especies micorrícicas de interés con muy bajos porcentajes de fallos por contaminación. Esta técnica es interesante para la producción de un inoculante miceliar el cual asegure una buena calidad a los viveristas, haciendo posible que puedan integrar la práctica de inoculación a sus tareas habituales en la elaboración de un plantín forestal. Además, la técnica de cultivo de micelio sobre papel también es una metodología útil para la conservación del material seleccionado, ya que se comprobó que luego de un período de guardado los materiales conservados sobre el mismo retomaron más rápido el crecimiento que los conservados sobre medio de cultivo agarizado. Se necesitarían estudios futuros en los que se compruebe con más exactitud el tiempo posible de conservación.

En cuanto a la obtención de plantines, a pesar de las limitaciones que tuvimos durante el año 2020 se pudo llevar a cabo exitosamente. Si bien la micorrización fue baja, hubo un efecto sobre el diámetro a la altura del cuello en los pinos inoculados con los aislamientos. Además, dentro de los índices evaluados, *S. granulatus* (trat. B), fue el de valores más cercanos a los aceptables. Este resultado nos sirve como punto de referencia de que se debería de mejorar con respecto a la micorrización controlada para obtener plantines robustos con buena supervivencia a campo y crecimiento. Tales puntos a mejorar serían aumentar el porcentaje de micorrización probando otras formas de inóculo; incluir una fertilización mineral u orgánica; probar otros fungicidas y cambiar el tipo de sustrato.

Esta experiencia sirvió para familiarizarme con el proceso de una investigación y mejorar mi capacidad de buscar soluciones ante las diferentes situaciones de conflicto, porque al momento de aplicar las metodologías encontradas en la bibliografía, surgían inconvenientes o situaciones a resolver diferentes de las planteadas en los textos. Relacionando los conocimientos de diferentes áreas adquiridos durante toda la carrera me fue posible interpretar y adaptar todas las ideas de las investigaciones previas a lo que uno es capaz de realizar en base a los recursos disponibles, y poder obtener resultados satisfactorios.

BIBLIOGRAFÍA

- Agerer R. 1995a. Anatomical Characteristics of Identified Ectomycorrhizas: An Attempt Towards a Natural Classification.
- Agerer R. 1995b. Colour atlas of ectomycorrhizae.
- Arrieta V.; Terés V. 1993. Caracterización física y química, y manejo agronómico de la corteza de pino (*Pinus radiata*) como sustrato de cultivo. CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL - Lourizán 1.993. Ponencias y comunicaciones. Tomo II; pp. 227-232.
- Barroetaveña C.; Bassani V.; Rajchemberg M. 2012. Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. Bosque 33: 163-169.
- Carneiro Araujo J. G. 1976. *Determinação do padrão de qualidade de mudas de Pinus taeda, l. para plantio definitivo*. Curso de pós-graduação em Engenharia florestal setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/28876/D%20->

%20JOSE%20GERALDO%20DE%20ARAUJO%20CARNEIRO.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Carrera Nieva A.; López Ríos G. F. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorizas en especies forestales. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, vol. 10, núm. 2: 93-98.
- Chávez M D.; Pereira C G.; Machuca H Á. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. BOSQUE 30(1): 4-9.
- Fassola H. E.; Lacorte S. M.; Pachas A. N.; Goldfarb C.; Esquivel J.; Colcombet L.; Crechi E. H.; Keller A.; Barth S. R. 2009. Los sistemas silvopastoriles en la región subtropical del NE argentino.
- García Rodríguez J. L. 2018. *Micorrización controlada de plántulas del género Pinus en vivero y su incidencia sobre atributos del material y del comportamiento*. Tesis de Doctorado Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Concepción. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/3254>
- García, M. A. 2007. Importancia de la calidad del plantín forestal. In: XXII Jornadas Forestales de Entre Ríos. Área Forestal de la EEA Concordia del INTA. Concordia, Entre Ríos, Argentina.
- Honrubia M.; Torres P.; Díaz G.; Morte A. 1995. Biotecnología Forestal: técnicas de micorrización y micropropagación de plantas.
- Lechner B.; Albertó E. 2011. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *P. albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Rev. Iberoam. Micol.* 28(4): 148-154.
- Lechner B.; Rugolo M.; Mallerma J. 2018. Hongos comestibles, el cultivo de *Flammulina velutipes* (enokitake). Colección ciencia joven. 46.
- Lodge D. J.; Ammirati J. F.; O'Dell T. E.; Mueller G. M.; Huhndorf S. M.; Wang C. J.; Stokland J. N.; Schmit J.P.; Ryvarde L.; Leacock P.R.; Mata M.; Umaña L.; Wu Q. F.; Czederpiltz D. 2004. Terrestrial and lignicolous macrofungi. En Mueller GM, Bills GF & Foster MS (eds.), *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press. San Diego: 127-172.
- López Alcalá J.; Barba Chávez J. M. A.; Márquez Ortega A. E.; Sánchez Gómez M. C.; López-Cruz J. I. 2012. Método de conservación acuosa del micelio de hongos. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. 1ª edición: 79-86.
- Luna C.V. 2019. Evaluación de sustratos y concentraciones de fertilizantes sobre el crecimiento de pino tadea (*Pinus taeda* L.) en vivero. *Rev. Agron. Noroeste Argent.* 39 (1): 19-29
- Moser M. 1983. Keys to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales). London, Roger Phillips: 535.

- Murrieta Hernández D. M.; Noa Carrazana J. C.; Mata Rosas M.; Pineda López M. del R.; Zulueta-Rodríguez R.; Flores-Estévez N. 2014. Efecto del medio de cultivo en el desarrollo de *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Pk.) Kuntze.
- Myco UAL. Universidad de Almería. Departamento de Biología Vegetal y Ecología. (s. f.). *Hongos beneficiosos y perjudiciales*. <https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/>.
- Niveiro N.; Popoff O. F.; Albertó E. O. 2009. Hongos comestibles silvestres: presencia de especies exóticas de *Suillus* (Boletales, Basidiomycota) y *Lactarius* (Russulales, Basidiomycota) asociadas a los cultivos de *Pinus elliottii* del nordeste argentino. *Bonplandia* 18 (1):65-71.
- Niveiro N. 2013. Agaricales sensu lato (Agaricomycetes) de las Selvas del Dominio Amazónico de la Argentina. Diversidad, Distribución y Abundancia. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
- Niveiro N.; Zuliani P.; Ramirez N.A.; Popoff O.F.; Albertó E.O. 2014. Clave de identificación de los Agaricales de las Yungas argentinas. *Lilloa* 51: 74–86.
- Nouhra E.; Becerra A. 2011. Síntesis micorrítica de *Suillus granulatus* (Eumycota) y plantines de *Pinus elliottii* (Pinaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 36(3-4): 209-215.
- Prieto Ruiz J. A.; Cornejo Oviedo E. H.; Domínguez Calleros P. A.; Návar Chaidez J. J.; Marmolejo Moncivais J. G.; Jiménez Pérez J. 2004. Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. *Invest Agrar: Sist Recur For* 13(3): 443-451.
- Raithelhuber J. 2004. Nueva flora micológica Argentina. Stuttgart, Germany: Mycosur. 576 p.
- Rentería-Chávez M. C.; Pérez-Moreno J.; Cetina-Alcalá V. M.; Ferrera-Cerrato R.; Xoconostle-Cázares B. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*; 49(1); pp. 93-104.
- Rodríguez Pastrana B. R.; Olivares Reyes A.; Zamora Martínez M. C. 2008. Guía técnica de reconocimiento de micorrizas.
- Sáenz Reyes J. T.; Muñoz Flores H. J.; Pérez C. M. Á.; Rueda Sánchez A.; Hernández Ramos J. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero “Morelia”, estado de Michoacán *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, vol. 5, núm. 26: 98-111.
- Smith D.; Kolkowski J. 1996. Fungi en Hunter-Cevera JC y Belt A (Ed.) *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1° Ed. Pp. 101-132), Academic Press, Inc.
- Toledo Carolina V.; Barroetaveña C.; Rajchenberg M. 2014. Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 1093-1103.
- Wolfgang K. 2013. A world-wide key to the genus *Suillus* Weltschlüssel der Gattung *Suillus*. *Österr. Z. Pilzk.* 22: 211-278.

Wright J.; Albertó E. 2002. Guía de los Hongos de La Región Pampeana. I. Hongos con laminillas. L.O.L.A. Buenos Aires. 279 p.