Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

INFORME FINAL DE LA ACCIÓN A4. TAREA A4.4, A4.5 y A4.6

Índice

DESARROLLO DE LA ACCIÓN 4.4 3

1. INOCULACIÓN A PARTIR DE FRUTO **4**

Actuaciones realizadas antes de la justificación parcial de Bosques Flotantes 4

1.1 OBTENCIÓN DE PLANTA 4

Actuaciones realizadas tras la primera justificación 7

1.2. FORMACIÓN DEL INÓCULO 7

1.3. AISLAMIENTO DE TEJIDO FÚNGICO 15

1.4 INOCULACIÓN DE PLANTA Y TRASPLANTE 16

2. INOCULACIÓN DE CASTAÑOS DEL VIVERO "EL PENDO" **21**

Actuaciones realizadas antes de la justificación parcial de Bosques Flotantes 21

2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO 21

2.2 FASES DE INOCULACIÓN 24

2.3 ANÁLISIS DE MICORRIZAS YA INSTAURADAS 26

Actuaciones realizadas tras la primera justificación 30

2.4 UNA NUEVA INOCULACIÓN 30

2.5 SENSIBILIZACIÓN Y VOLUNTARIADO 31

3. REFORESTACIÓN CON 2.500 EJEMPLARES DE ARBOLADO AUTÓCTONO EN CEPELLÓN MICORRIZADO 33

4. ACCIONES DE MANTENIMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LA PLANTACIÓN 36

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

ACCIÓN 4. Revertir el proceso de deforestación histórica, restaurando espacios forestales degradados con implantación de especies forestales micorrizadas

A4.4. Reforestación con arbolado autóctono en cepellón micorrizado

Entidades participantes de la subacción:

Universidad de Salamanca

Fundación para la Investigación del Clima

La recuperación de medios degradados es una pieza fundamental de la política ambiental comunitaria como parte de una estrategia de reversión de tales zonas a áreas susceptibles de ser parte de una infraestructura verde adaptada al cambio climático. Una iniciativa que refuerza el valor de dichas áreas es la inclusión de medidas que aporten un valor extra implementadas en el diseño de la conversión. En el caso de los monocultivos de eucalipto, se ha comprobado que degradan las condiciones del suelo, consumen una gran cantidad de agua e influyen negativamente sobre los cauces hídricos. A esto se suma la pobreza en especies que tienen los monocultivos de eucalipto. Por esto es recomendable una reversión paulatina de los eucaliptales en bosques de composición autóctona, de acuerdo con la idoneidad climática futura del lugar.

El eucalipto azul (*Eucalyptus globulus* Labill.) es considerado como especie exótica, y su cultivo como materia prima para pasta de papel se ha generalizado en el Cantábrico, habiendo desplazado totalmente al bosque autóctono en la mayoría de montes de las zonas más bajas. Los eucaliptales inciden muy negativamente en la calidad del suelo por la composición química de la hojarasca que generan.

En esta acción se ha trabajado en distintas fincas cuya a actividad estaba dedicada al monocultivo de eucalipto revirtiendo a un estado de bosque autóctono, plantando especies arbóreas tan significativas como el castaño.

Todos los plantones han sido inoculados con micelio de cuatro hongos comestibles y de interés económico en su sistema radicular. De este modo, no sólo se recuperará el ecosistema idóneo climáticamente en dichos terrenos, sino que además se obtendrán unos recursos de valor en forma de castañas y setas comestibles.

***Bosques Flotantes** cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Objetivos

- Reconvertir la estructura forestal alóctona existente en un modelo alternativo de aprovechamiento forestal.
- Incorporar medidas de adaptación y resiliencia al cambio climático en las actividades de reconversión de la infraestructura forestal.
- Implementar modelos alternativos de renta basados en recuperación de estructuras forestales autóctonas y aprovechamientos de productos adheridos (frutos, hongos, etc.).
- Incorporar medidas que seguimiento que permitan el mantenimiento de la plantación en condiciones adecuadas.

Actividades realizadas

A4.1 Compra de un terreno forestal (por Fundación Naturaleza y Hombre).

A4.2 Reacondicionamiento de la parcela, con eliminación de vegetación alóctona (*Eucaliptus* sp.), aireación del suelo, solarización para reducir las micorrizas existentes en el terreno.

A4.3 Análisis de idoneidad climática de especies arbóreas como el castaño, para el área de reforestación, en escenarios de clima futuro.

A4.4 Reforestación con arbolado autóctono en cepellón micorrizado.

A4.5 Acciones de mantenimiento de la plantación, mediante reposiciones de marras, restitución del material deteriorado, reparaciones en los cerramientos, entre otras.

A4.6 Seguimiento de la evolución de las actuaciones realizadas.

DESARROLLO DE LA ACCIÓN 4.4

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de castaño (*Castanea sativa* Mill.) se han visto mermadas durante las últimas décadas en muchas regiones debido, sobre todo, a los cambios sociales en las zonas rurales, al cambio climático y la acción de agentes patógenos.

Por otro lado, existen hongos que se caracterizan porque, para desarrollar su ciclo vital por completo, necesitan establecer relaciones simbióticas con las raíces de plantas vasculares. Esta relación se establece mediante la formación de unas estructuras que permiten el intercambio de nutrientes, las micorrizas. Así pues, estas son asociaciones entre las raíces de las plantas y el micelio de un hongo donde ambos organismos salen beneficiados ya que mejora la producción tanto del árbol como del hongo, mejora la absorción de nutrientes, la resistencia a enfermedades y al estrés, lo que ayuda a incrementar la producción de frutos además favorece la sostenibilidad

al ser una práctica totalmente sostenible: mejora la salud del suelo, promueve una mayor biodiversidad y reduce la necesidad de emplear fertilizantes y pesticidas.

Parece, por lo tanto, importante potenciar el cultivo de castaños que además estén micorrizados con hongos que tengan interés económico ya que pueden aportar beneficios adicionales como, por ejemplo, el incremento del nivel económico en las zonas donde se cultivan ayudando a que las áreas rurales sean más productivas debido el establecimiento de plantaciones de cultivos múltiples, donde el sector únicamente tendrá que mantener el cultivo para su beneficio y explotación.

Para el correcto desarrollo de las actuaciones de este proyecto, se decidió realizar dos líneas de inoculación de cara a obtener los mejores resultados en cuanto a micorrización y supervivencia de las plantas. Por ello se realizó una inoculación a partir de semilla recolectada en campo (lo que daría como resultado una buena micorrización pero que, debido a la duración del proyecto, se plantarían en campo plántulas de corta edad y tamaño) y, por otro lado, se inocularon castaños que ya estaban crecidos, ubicados en el Vivero "El Pendo" propiedad de la Fundación Naturaleza y Hombre (donde ya tenemos planta de mayor tamaño, pero con grandes riesgos para conseguir una micorrización exitosa debido a la presencia de competidores de cara a colonizar las raíces de los castaños).

Se detallan a continuación ambas líneas de acción diferenciando las actuaciones realizadas antes y después de la justificación parcial del proyecto.

1. INOCULACIÓN A PARTIR DE FRUTO

Actuaciones realizadas antes de la justificación parcial de Bosques Flotantes

1.1 OBTENCIÓN DE PLANTA

Durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2024, han sido recolectados distintos lotes de castañas, de ejemplares diferentes para obtener mayor biodiversidad, procedentes de tres zonas geográficas: la sierra de la provincia de Salamanca, montaña y meseta interior de Galicia y Navarra.

En total se sembraron 3.000 castañas con la idea de obtener unas 1.000 – 2.000 plantas lo suficientemente bien formadas como para poder reforestar la zona de interés. Previamente, se han seleccionado aquellos frutos que se encontraban en buen estado: color externo marrón sin manchas, sin perforaciones, pudriciones o cualquier otro tipo de alteración, si bien es cierto que gran cantidad de las que tenían buena apariencia y turgencia externa, al abrirlas no presentaban un aspecto sano (imagen 1.1). Al realizar un estudio a fondo del problema, consideramos que las castañas podían estar infectadas por una podredumbre parda, producida quizás por

***Bosques Flotantes** cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Gnomoniopsis castaneae (synonym *Gnomoniopsis smithogilvyi*). Las castañas procedentes de las Sierras de Salamanca no han mostrado podredumbre parda; las procedentes de Galicia la han presentado entre un 10 y un 15% y las procedentes de Navarra en un 70%, aproximadamente. Consideramos que el grado de afectación general ha sido elevado sobre todo en una de las tres poblaciones, por lo que finalmente no ha sido posible conseguir las 2.000 plantas.



Imagen 1.1. Embrión afectado en castañas aparentemente sanas.

Tras esta selección, los frutos se sometieron a un proceso de lavado con agua y posteriormente se desinfectaron con lejía al 10% durante una hora, previo a la siembra.

Entre los meses de diciembre y enero de 2025 se pusieron a germinar las castañas en bandejas forestales con alveolos de 300cm^3, con una mezcla en volumen de sustrato universal y vermiculita de 4:1 (imagen 1.2).

En marzo de 2025, las castañas empezaron a germinar y las primeras plántulas a emerger en el invernadero (imagen 1.3).

Una vez que empezaron a germinar se retiraron las bandejas inferiores y se colocaron directamente encima de una rejilla. Siguiendo un procedimiento encaminado a conseguir el autorrepicado de la raíz primaria: al sobresalir del sustrato y entrar en contacto con el aire se necrosa y estimula la producción de raíces secundarias, que son las que coloniza el hongo simbionte.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 1.2. Trabajo de siembra en alveolos forestales, mantenimiento en invernadero.



Imagen 1.3. Primeras plántulas de *Castanea sativa* de la población de Salamanca.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero a una temperatura de entre los 15 y los 20ºC y con una humedad del 60% aproximadamente. La frecuencia de riego superficial ha sido de 1-2 veces por semana en función de las necesidades.

Todo el material empleado en el proceso ha sido previamente desinfectado con lejía: bandejas de germinación, cajas de plástico, bancadas del invernadero, etc.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

1.2. FORMACIÓN DEL INÓCULO

La inoculación se realizó con esporas correspondientes a los cuerpos fructíferos de distintos hongos:

- *Boletus edulis* Bull.
- *Amanita ponderosa* Malençon & Heim.
- *Tuber borchii* Vitt.
- *Tuber melanosporum* Vitt.

previamente tratados en el laboratorio según se detalla a continuación y que estuvieron conservados hasta que las plántulas tuviesen un tamaño adecuado.

Cabe mencionar las diferencias significativas entre los hongos elegidos. Por un lado, *Boletus edulis* y *Amanita ponderosa* son basidiomicetos, ya que pertenecen a la división Basidiomycota y su reproducción sexual se produce en estructuras llamadas basidios, que forman las esporas en su exterior. Sin embargo, los otros dos hongos, del género Tuber (*T. melanosporum* y *T. borchii*), son ascomicetos, pertenecientes al filo Ascomycota, caracterizado por producir sus esporas sexuales en el interior de unas estructuras llamadas ascas (imagen 1.4).

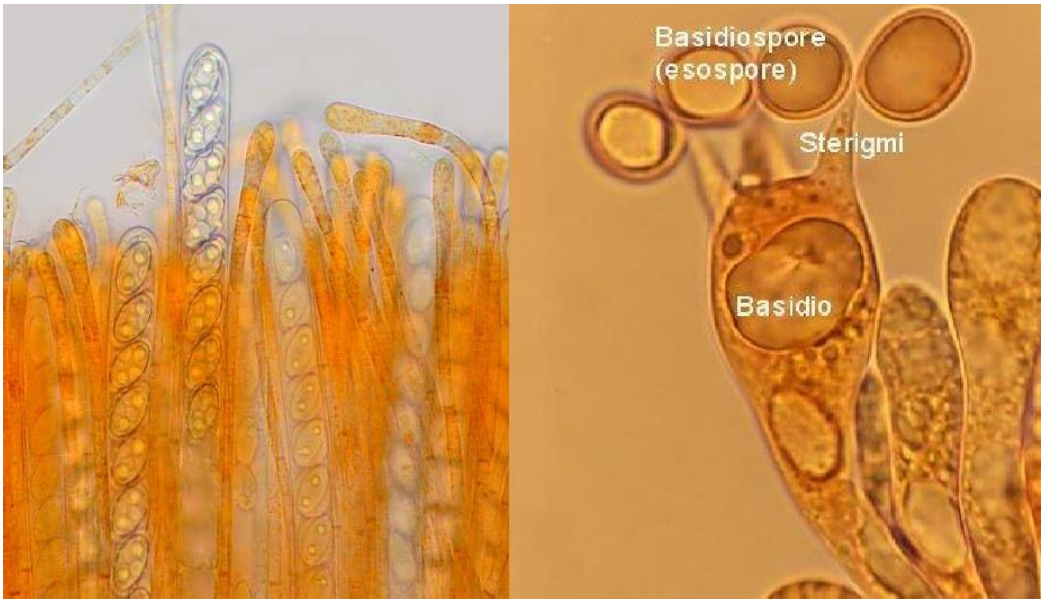


Imagen 1.4. A la izquierda imagen al microscopio óptico de un ascomiceto donde se ven las ascas con las ascósporas en su interior y a la derecha un basidiomiceto donde se aprecia el basidio con las basidiósporas en la parte superior.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Boletus edulis, es una seta comestible muy apreciada por su sabor a nuez y textura carnosa, destacando por un sombrero convexo de color marrón (más oscuro en el centro) y una línea blanquecina en su borde, además de un pie robusto y blanquecino con una característica retícula blanca en la parte superior (careciendo de láminas), mientras su carne es blanca, firme y de olor agradable, volviéndose amarillenta bajo los poros que cambian de blanco a verdoso con la madurez, siendo una especie muy valorada en gastronomía y fácil de identificar por estos rasgos.



Imagen 1.5. Arriba, uno de los ejemplares de *Boletus edulis* empleados para la inoculación, en este caso, recolectado en la sierra de Salamanca, abajo a la izquierda sus basidiósporas y abajo a la derecha, sección de un cuerpo fructífero de un boletal donde se aprecian los tubos en el interior de los cuales se desarrollan las esporas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Amanita ponderosa (gurumelo) es una seta comestible, también robusta y de gran tamaño, apreciada por su carne blanca y compacta que se enrojece al corte y su olor terroso, con un sombrero inicialmente hemisférico que se aplana, un pie macizo con un anillo fugaz, y una volva grande y abolsada. Esta especie tiene láminas en vez de tubos y crece bajo tierra en bosques mediterráneos de encinas y alcornoques, emergiendo a finales de invierno y principios de primavera.



Imagen 1.6. A la izquierda, ejemplares de *Amanita ponderosa* empleados para la inoculación, recolectados en la provincia de Extremadura; a la derecha arriba, esporas de esta especie al microscopio óptico; a la derecha abajo, uno de los ejemplares de esta especie recolectado en la sierra de Salamanca. Abajo a la derecha un detalle de las láminas y a la izquierda una lámina al microscopio donde se aprecian los basidios y las basidiósporas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Tuber melanosporum, o trufa negra, es un hongo subterráneo muy apreciado en gastronomía, con una forma irregular y una superficie exterior (peridio) oscura y rugosa que se vuelve negra al madurar, revelando un interior (gleba) negro-violáceo surcado por venas blancas, con un aroma intenso y único que la convierte en un lujo culinario, creciendo en simbiosis bajo tierra con raíces de árboles como robles, encinas o castaños.



Imagen 1.7. Algunos de los ejemplares de *Tuber melanosporum* empleados para la inoculación, todos ellos recolectados en la provincia de Salamanca. Abajo a la izquierda un detalle al microscopio óptico del asca con las cuatro ascosporas. Abajo a la derecha, sacando trufa de una de las encinas micorrizadas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Tuber borchii, o trufa blanca de primavera, es un hongo subterráneo comestible de tamaño pequeño a mediano (garbanzo a huevo), con un peridio liso de color blanco-amarillento a marrón-rojizo y una gleba compacta con venas blancas que madura en invierno y primavera, ofreciendo un aroma agradable y terroso, a menudo con notas de ajo silvestre, que la hace muy valorada en la cocina, especialmente en Italia, donde se le conoce como "bianchetto".



Imagen 1.8. Dos de los ejemplares de *Tuber borchii* empleados para la inoculación, en este caso, recolectado en la provincia de Teruel.

***Bosques Flotantes** cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Pero, ¿por qué hemos elegido estas especies?

En cuanto a las dos primeras *Boletus edulis* tiene un gran interés gastronómico siendo una de las especies más apreciadas tanto en cocina tradicional como en alta cocina, al igual que *Amanita ponderosa* que, además, es especialmente interesante para este estudio ya que, aunque es propia de zonas extremeñas y andaluzas, siempre encontrada por debajo del Sistema Central, debido al cambio climático cada vez se encuentra más al norte de la península, como en la provincia de Salamanca. Creemos que puede ser una especie con gran interés por descubrir en latitudes mayores.

Por otro lado, el género *Tuber*, también es muy apreciado en gastronomía, sobre todo en Francia e Italia por su tradición en el consumo de estos hongos. En España cada vez tiene más adeptos y su uso se está generalizando, sobre todo *Tuber melanosporum*, que es la especie cultivada más rentable económicamente, su precio puede oscilar (según temporada y calidad de la trufa) entre los 200 y 900 €/Kg (precios comprando directamente a los agricultores, sin intermediarios), pero necesita unas características específicas para que su cultivo tenga éxito (por ejemplo, un pH mayor de 7,5), siendo la zona cántabra poco apta para que este hongo crezca con facilidad. Precisamente por ello se decidió inocular también con *Tuber borchii* ya que, aunque el valor económico sea más bajo (entre 50 y 200 €/Kg), sí es factible su cultivo en suelos como los que nos encontramos en este proyecto, con pH más ácidos.

En definitiva, las cuatro especies elegidas tienen un gran interés económico y pueden formar micorrizas con las raíces de castaño.

En este sentido, es importante aclarar qué son las micorrizas, para que se pueda entender mejor la finalidad de esta subacción del proyecto Bosques Flotantes. Estas estructuras, son el resultado de la simbiosis entre un hongo y las raíces de la planta, en este caso, castaño. Esta simbiosis ayuda a que la planta tenga más agua y nutrientes y a obtener una mayor protección y por su parte, el hongo obtiene hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas y la posibilidad de reproducirse sexualmente.

En términos generales, las micorrizas pueden dividirse en endomicorrizas donde los hongos que las producen se caracterizan por colonizar intracelularmente el córtex radical formando estructuras tan llamativas como las vesículas o los arbúsculos (imagen 1.9) y las ectomicorrizas donde los hongos que las forman desarrollan una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces nutricias de la planta (imagen 1.10). Estas últimas son las que nos interesan ya que todos los hongos elegidos forman ectomicorrizas con las raíces de castaño.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

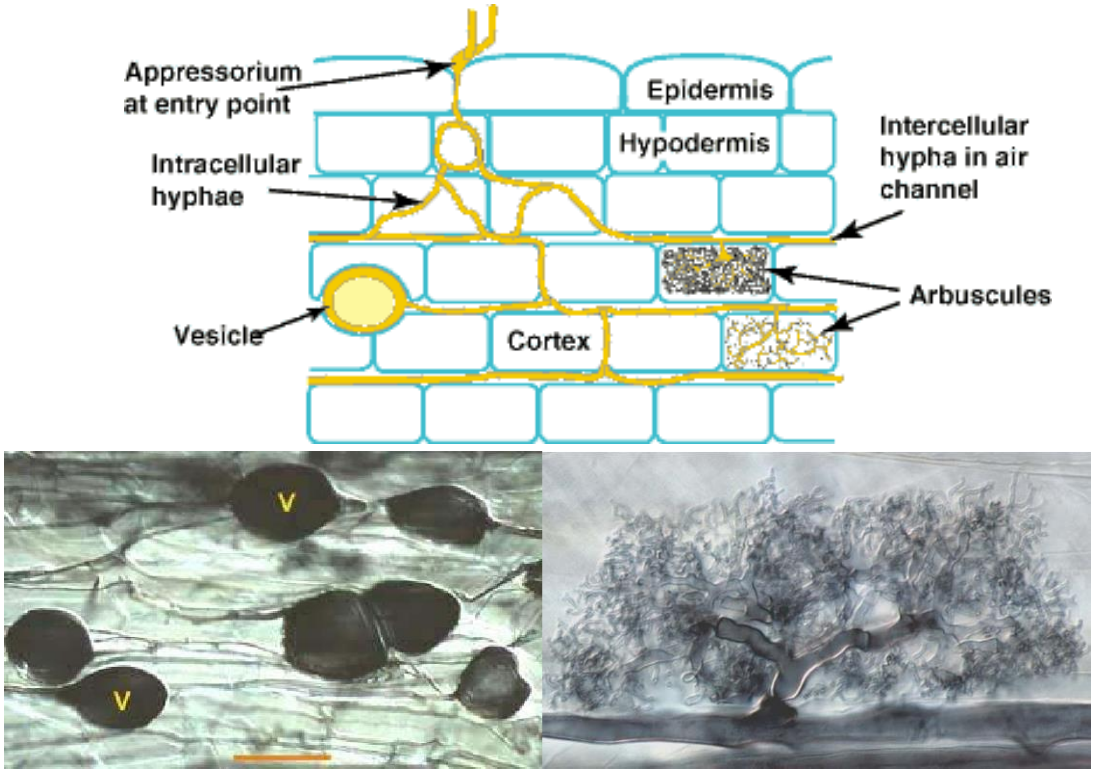


Imagen 1.9. Esquema de una endomicorriza en la parte superior. Abajo a la izquierda estructuras características: vesículas, abajo a la derecha un arbúsculo.

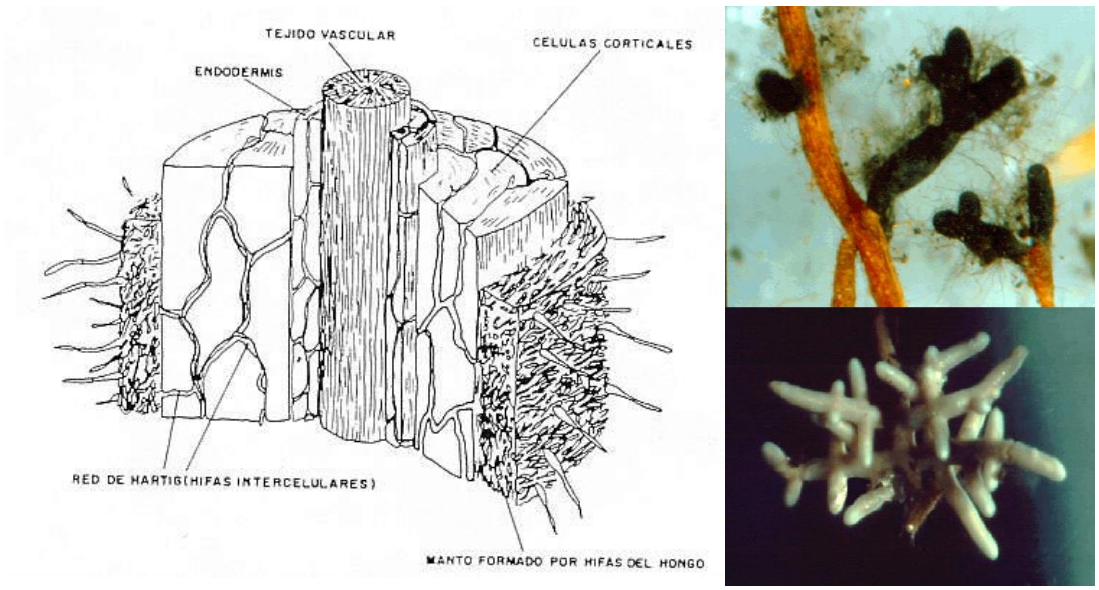


Imagen 1.10. Esquema de una ectomicorriza y manto de hifas de dos especies diferentes visto al microscopio esteroscópico.

***Bosques Flotantes** cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Por lo tanto, habiendo analizado ya los diferentes tipos de hongos y la formación de micorrizas, el proceso de preparación del inóculo en todos los casos es semejante y está explicado en detalle en el apartado 2.1 del presente informe para el caso de *Amanita ponderosa*. Dando aquí algunas otras pinceladas de interés basándonos en el procedimiento realizado a *Tuber melanosporum* para que sirva como ejemplo.

Los cuerpos fructíferos tienen que ser seleccionados y clasificados para que no haya ninguna confusión en cuanto a que todos sean la misma especie (imagen 1.11 izquierda), si fuese necesario se realizarán estudios genéticos para su identificación completa.

Una vez se tiene la certeza de que los carpóforos son de la especie de interés, deben ser lavados y desinfectados empleando incluso en el caso de *Tuber* un baño de ultrasonidos (imagen 1.11, derecha).



Imagen 1.11. Selección de carpóforos de *Tuber melanosporum* en laboratorio y, tras el cepillado, eliminación de impurezas en el baño de ultrasonidos.

La desinfección es necesaria para evitar el crecimiento de otros posibles hongos que estuviesen en la superficie y pudiesen proliferar compitiendo con el que nos interesa.

Después ya se laminan y dejan secar en estufa como se explica más adelante para tener un inóculo seco con gran cantidad de esporas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

1.3. AISLAMIENTO DE TEJIDO FÚNGICO

En el caso de *Boletus edulis*, previamente a la inoculación del hongo con las raíces de los castaños para formar ectomicorrizas, se han realizado aislamientos a partir de los hongos frescos en una cabina de flujo laminar provista de un mechero de alcohol y un vaso de precipitados con etanol al 70% con el fin de esterilizar el material empleado (pinzas, escalpelos, lanceta, etc.) durante los diferentes pasos de la extracción.

La zona de tejido idónea para el aislamiento es la que se encuentra por encima de los tubos, aunque también puede obtenerse a partir del pie, siempre que se encuentre libre de contaminaciones de cara a obtener micelio únicamente del hongo de interés.

Para la obtención de fragmentos de tejido estériles, cada ejemplar se lavó con etanol al 70%. Se intentó desprender la cutícula del sombrero y se realizó un corte poco profundo a lo largo de la superficie de éste con un escalpelo previamente esterilizado.

Las dos partes se separaron con las manos. Del tejido interno que quedó expuesto se extrajeron pequeños fragmentos con ayuda de un escalpelo y pinzas en condiciones estériles (imagen 1.12).

Se evitaron las zonas con galerías de gusanos y cualquier otra que fuera una posible fuente de contaminación. Los fragmentos obtenidos se cortaron ya en placas de Petri asépticas en trozos más pequeños, de 3 x 3 mm aproximadamente.



Imagen 1.12. Extracción de tejido de *Boletus edulis* para crecimiento de micelio en placa PETRI con medio de cultivo.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

En el caso de *Tuber borchii* también se consiguió aislar el hongo y crecer micelio en placa Petri con medio de cultivo conocido como PDA (Patata-Dextrosa-Agar) como se puede apreciar en la imagen 1.13.

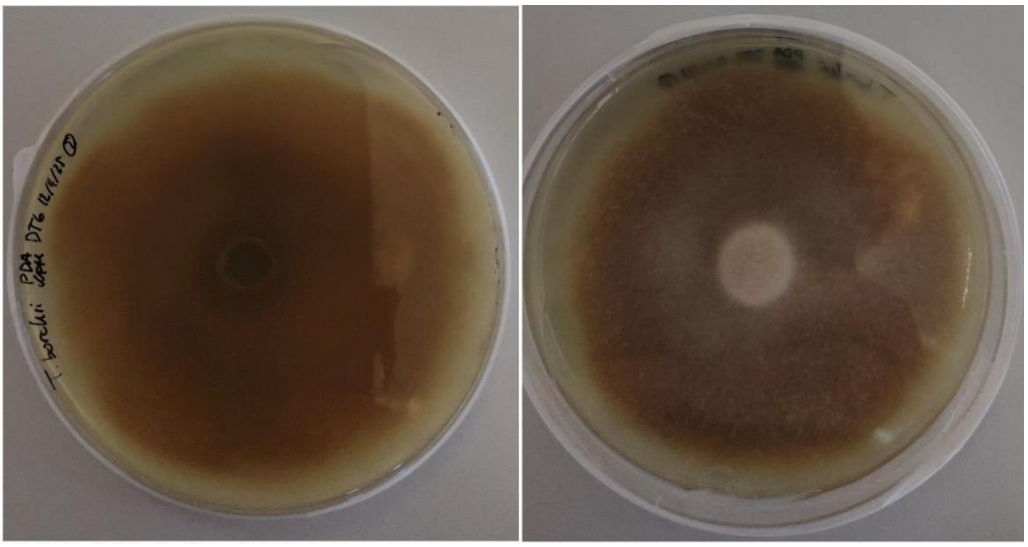


Imagen 1.13. Placas Petri con medio de cultivo (PDA) y micelio creciendo de *Tuber borchii*.

Todas estas placas Petri con micelio se emplearon para reforzar la inoculación realizada con esporas.

1.4 INOCULACIÓN DE PLANTA Y TRASPLANTE

El proceso de inoculación necesario para la formación de micorrizas se incluye dentro de los objetivos de este proyecto, pero sus resultados no podrán ser analizados hasta pasado mínimo un año tras la inoculación para comenzar a ver resultados.

De hecho, lo ideal sería a los tres años realizar análisis de las raíces para comprobar el porcentaje de micorrización existente para ver la evolución en campo (imagen 1.14).

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 1.14. Extracción de muestras de raíces en cilindro para analizar el porcentaje de micorrización en laboratorio.

Siguiendo con las acciones del proyecto, transcurridos cuatro meses desde su siembra, las plantas se encontraban en condiciones adecuadas para ser sometidas a los procesos de inoculación y el inóculo de cada una de las especies también estaba preparado.

Se han laminado y secado los cuerpos fructíferos de las cuatro especies para obtener después por una parte un polvo rico en esporas. Estas esporas fueron mezcladas con polvo de talco estéril (1 g por planta) y se inocularon por espolvoreo a lo largo de las raíces desnudas. Por otra parte, a los carpóforos laminados y secos se les añadió agua para obtener un caldo rico en esporas, sumergiendo las raíces desnudas de los castaños.

En ambos casos, las plantas se introdujeron en alveolos forestales con un sustrato con la siguiente composición en peso: 80% de tierra, 18% de turba y 2% de perlita. Se mantuvieron en el invernadero a una temperatura de 20-26ºC y se regaron por nebulización en superficie para evitar la pérdida del inóculo por lavado.

Como ya se ha comentado, en los casos en los que se ha conseguido que crezca micelio en placa PETRI, éste ha sido añadido al inóculo para aumentar las posibilidades de éxito.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Finalmente, tras la germinación e inoculación de los plantones de castaño, se consiguieron unas 700 plantas con buen aspecto y sanas (tabla 1.1), número menor al que se había planteado inicialmente creemos que también porque algunas de esas plantas sufrieron un secado foliar probablemente provocado por alguna enfermedad (imagen 1.15).



Imagen 1.15. Bandejas forestales con plantas de castaño afectadas por una enfermedad que seca sus hojas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Tabla 1.1. Detalle de las bandejas con alveolos forestales, la especie inoculada en cada caso y el número de plantones conseguidos.

Etiqueta	Especie inoculada	Número de plantones
1	Gurumelo (*Amanita ponderosa*)	35
2	Gurumelo (*Amanita ponderosa*)	35
3	Gurumelo (*Amanita ponderosa*)	35
4a	Gurumelo (*Amanita ponderosa*)	7
4b	Trufa de verano (*Tuber borchii*)	28
5	Trufa de verano (*Tuber borchii*)	35
6	Trufa de verano (*Tuber borchii*)	35
7	Trufa de verano (*Tuber borchii*)	35
8	Trufa de verano (*Tuber borchii*)	35
9	*Boletus edulis*	54
10	*Boletus edulis*	54
11	*Boletus edulis*	54
12a	*Boletus edulis*	54
12b	Trufa negra (*Tuber melanosporum*)	24
13	Trufa negra (*Tuber melanosporum*)	35
14	Trufa negra (*Tuber melanosporum*)	35
15	Trufa negra (*Tuber melanosporum*)	54
16	Trufa negra (*Tuber melanosporum*)	54

Especie inoculada	Número de plantones
Amanita ponderosa	133
Tuber borchii	147
Boletus edulis	216
Tuber melanosporum	202
TOTAL	**698**

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Todos estos plantones sanos (imagen 1.16) se llevaron, el día 29 de septiembre de 2025, al vivero "El Pendo" para continuar con su plantación en campo antes de la finalización del proyecto.

En los invernaderos de la Universidad de Salamanca se mantiene el resto de ejemplares para su posible recuperación más adelante.



Imagen 1.16. Fotografías de algunas de las bandejas con los castaños ya inoculados previamente a la llegada al vivero "El Pendo".

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

2. INOCULACIÓN DE CASTAÑOS DEL VIVERO "EL PENDO"

Actuaciones realizadas antes de la justificación parcial de Bosques Flotantes

2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se decidió realizar una inoculación en la planta de vivero localizada en Cantabria con *Amanita ponderosa* (gurumelo).

Fueron adquiridos los carpóforos de dicho hongo a una empresa especializada (imagen 2.1) debido a que la recolección de estas setas maduras (entre los meses de febrero y abril) tendría que haberse realizado previo a la posibilidad de contratación de personal dedicado al proyecto.



Imagen 2.1. Carpóforos de *Amanita ponderosa*.

Tras su adquisición se las dejó varios días en temperatura y humedad controladas para favorecer en lo posible la esporulación y maduración. Posteriormente se procedió a su limpieza con agua para eliminar los restos de tierra, etc. y después a desinfectar los cuerpos fructíferos para evitar contaminaciones de otros hongos o levaduras, introduciéndolos en lejía diluida al 10% durante 15 minutos (Imagen 2.2).

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 2.2. Carpóforos de gurumelo introducidos en lejía diluida al 10%.

Una vez desinfectados se procedió a su secado ya que es necesario conservarlos sin dañar sus estructuras. En este sentido, se laminaron todos los cuerpos fructíferos (imagen 2.3), se dispusieron sobre papel de filtro (imagen 2.4 izquierda) y se dejaron a temperatura ambiente.



Imagen 2.3. Cuerpos fructíferos de *Amanita ponderosa* laminados.

Cada semana se volteaban para evitar acumulación de humedad y proliferación de hongos contaminantes hasta su secado total (imagen 2.4 derecha).

Una vez secas las láminas de gurumelo, se conservaron en bolsas con cierre hermético hasta el momento de inocular en el vivero (imagen 2.5).

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 2.4. Evolución en el secado de los carpóforos a temperatura ambiente.



Imagen 2.5. Conservación del hongo en bolsas herméticas.

En el momento en el que se decidió inocular, se procedió a preparar el inóculo en humedad. Para ello, se batieron las láminas secas de *Amanita ponderosa* con agua y se introdujo la mezcla en un contenedor con grifo para su mejor transporte al Vivero "El Pendo" (imagen 2.6).

Se trata de que, junto a los restos de hifas, vayan esporas que puedan germinar como inóculo en los contenedores de las plántulas ya crecidas en el vivero.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 2.6. Preparación del inóculo.

2.2 FASES DE INOCULACIÓN

Han sido inoculadas 2.500 plantas de las cuales, la mitad correspondían a plantones de una añada y la otra mitad a plantones de dos años. Se han mantenido sin inocular 100 ejemplares de cada añada (200 en total) como control que se mantendrán en el Vivero "El Pendo" hasta el momento de la plantación (imagen 2.7) al igual que el resto de castaños inoculados.



Imagen 2.7. 200 plantas control ubicadas en el Vivero "El Pendo": a) 100 ejemplares de primer año y b) 100 ejemplares de segundo año.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

La inoculación se realizó en dos fases distintas, una el 26 de octubre de 2024 y la siguiente unos 15 días después, el 11 de noviembre de ese mismo año.

En ambas fases el procedimiento fue el mismo: se emplearon 10 ml de inóculo por planta medidos con vasos de precipitados y se "regaron" en superficie (imágenes 2.8 y 2.9) con la idea de que el inóculo se vaya introduciendo en el sustrato hasta llegar a las raíces y así puedan formarse las micorrizas.



Imagen 2.8. Primera inoculación en el Vivero "El Pendo" el día 26 de octubre de 2024.



Imagen 2.9. Segunda inoculación en el Vivero "El Pendo" el día 11 de noviembre de 2024.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

2.3 ANÁLISIS DE MICORRIZAS YA INSTAURADAS

De todos los castaños localizados en el vivero, se han tomado al azar seis plantas de un año y otras seis de segunda añada para el análisis de sus raíces (imagen 2.10).

Con ello, se pretendía conocer las micorrizas que ya están desarrolladas en estas plantas y así poder comprobar la posible competencia, según los hongos existentes, que puede dificultar la micorrización con el hongo ectomicorrícico elegido, *Amanita ponderosa*.



Imagen 2.10. Plantas seleccionadas para comprobar la micorrización presente.

Las muestras se introdujeron en agua para facilitar la separación de la turba adherida a las raíces (imagen 2.11), se lavaron cuidadosamente sobre un tamiz de 0,5mm de luz de malla para evitar la pérdida de ápices radicales.

En algunos casos fue necesario limpiar las micorrizas al microscopio estereoscópico con ayuda de pinzas y/o, el empleo de agua con Tween® 80 al 0,2% e incluso de un baño de ultrasonidos para eliminar las partículas de suelo adheridas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 2.11. Eliminación de la turba del cepellón, de castaños de uno y dos años.

Una vez limpias las raíces, se colocaron en placas de Petri con agua para observarlas al microscopio estereoscópico (imágenes 2.12 y 2.13), donde se realizó una primera clasificación de los tipos micorrícicos presentes en función de caracteres como pilosidad, color, tipo de ramificación, presencia y color de sus rizomorfos, etc.



Imagen 2.12. Observación de una de las muestras a la lupa y selección de micorrizas según su apariencia.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Posteriormente se comprobó al microscopio óptico la homogeneidad de cada grupo, evitando así que alguno estuviese formado a su vez por varias especies o al contrario, que algún morfotipo muy variable se divida en dos o más grupos.

La primera observación de cada morfotipo al microscopio se realizó siempre montando las preparaciones con agua y sólo en casos de micorrizas muy pigmentadas se recurrió al ácido láctico, que permite un mayor contraste y aclara ligeramente las estructuras.

Para poder observar correctamente el manto de la mayoría de tipos, fue necesario separarlo del ápice con una aguja y unas pinzas o realizar cortes de este (imagen 2.14). Todos los tipos micorrícicos se conservaron a -20ºC, con idea de valorar su posible identificación mediante técnicas de análisis molecular más adelante, si se considera necesario.



Imagen 2.13. Cuatro de los diferentes morfotipos vistos al microscopio esteroscópico.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 2.14. Vista de micorriza al microscopio óptico a 20X aumentos (a) y vista del manto a 40X aumentos (b).

Las conclusiones que se pueden sacar de esta acción son que el porcentaje de micorrización en todas las plantas estudiadas, tanto las de un año como las de dos es muy elevado (entre el 85 y 90%). Se han podido diferenciar más de 5 tipos distintos de micorrizas, pero no se han identificado a nivel de género y especie.

Esta labor de estudio de las micorrizas establecidas previamente en los castaños de "El Pendo" era imprescindible para hacernos una idea de la competencia con la que se encontrará *Amanita ponderosa* para crecer y formar micorrizas con las raíces de esos castaños.

La presencia de micorrizas en más de un 85 % de las raíces de los castaños nos indica que la inoculación debe seguir manteniéndose para intentar conseguir micorrizas de *Amanita ponderosa*. Aunque somos conscientes de que el éxito de esta micorrización se ve claramente comprometido.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Actuaciones realizadas tras la primera justificación

2.4 UNA NUEVA INOCULACIÓN

Una vez más se inocularon las plantas que permanecían en el vivero "El Pendo" esta vez en vez de ser con inóculo húmedo se realizó con inóculo seco, mezclado con talco (imagen 2.15).



Imagen 2.15. Inoculación en el vivero "El Pendo" con esporas de *Amanita ponderosa* mezcladas con talco.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

2.5 SENSIBILIZACIÓN Y VOLUNTARIADO

Una vez que se realizaron las distintas campañas de inoculación en los castaños del vivero "El Pendo", y tras algunos meses se organizaron, por parte de Fundación Naturaleza y Hombre diversas jornadas de voluntariado para su plantación en los terrenos propuestos para este proyecto, habiéndose eliminado previamente los eucaliptos.

Desde la Universidad de Salamanca fuimos a algunas de esas jornadas de voluntariado (imagen 2.16). En ellas explicamos a los asistentes la importancia de la micorrización y su proceso, por lo que llevamos también inóculo para incluir en los agujeros donde se pondrían los castaños.



Imagen 2.16. Jornadas de voluntariado para la plantación de castaños inoculados en el pueblo de Rubalcaba, cerca de Liérganes, Cantabria. En las imágenes inferiores se aprecia en detalle la plantación de uno de los ejemplares donde se añade más inóculo mezclado con talco para mayor aporte de esporas y posteriormente el plantón con cepellón.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

Dentro del proyecto Bosques Flotantes también impartimos desde la Universidad de Salamanca, una charla de divulgación sobre "La importancia de la micorrización y el cultivo de la trufa" en el Fluviarium de Liérganes el 28 de marzo de 2025 (imagen 2.17).

Colaborando así con una parte importantísima que es la sensibilización en la protección de la naturaleza.



Imagen 2.17. Charla impartida por Silvia Sánchez, investigadora de la Universidad de Salamanca en el Fluviarium de Liérganes propiedad de Fundación Naturaleza y Hombre.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

3. Reforestación con 2.500 ejemplares de arbolado autóctono en cepellón micorrizado.

Con el fin de recuperar la estructura y funcionalidad del bosque autóctono en la parcela de actuación, se procedió a la reforestación mediante la plantación de un total de 2.500 ejemplares en cepellón micorrizado.

La especie principal empleada fue el castaño (*Castanea sativa*), con 2.000 ejemplares inoculados con una mezcla de hongos micorrícicos compuesta por *Boletus sp*., trufa (*Tuber sp*.) y seta de los caballeros (Amanita ponderosa), combinación que favorece el establecimiento radicular, mejora la captación de nutrientes y aporta un valor añadido en términos de producción de hongos comestibles de alto valor.

Los 500 ejemplares restantes se distribuyeron en función de las características específicas del terreno —orientación, humedad y tipo de suelo—, utilizándose fresno (*Fraxinus sp*.), alcornoque (*Quercus suber*), abedul (*Betula sp*.) y tilo (*Tilia sp*.) como especies acompañantes, junto a *Fagus sylvatica, Quercus pyrenaica y Q. petraea*, contribuyendo así a una mayor diversidad estructural y funcional del nuevo ecosistema forestal.



Imagen 3. Perfil de reforestación.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*





Imagen 3.1 y 3.2 Reforestación distintas zonas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*







Imagen 3.3, 3.4 y 3.5 Reforestación distintas zonas.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

4. ACCIONES A4.5 Y A4.6 DE MANTENIMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LA PLANTACIÓN

Con posterioridad a la plantación, se llevaron a cabo las acciones necesarias para garantizar la supervivencia y adecuado desarrollo de los plantones. En el marco de la A4.5, se ejecutaron labores de mantenimiento de la plantación que incluyeron la reposición de marras, la restitución del material vegetal deteriorado y la reparación de los cerramientos, asegurando así la protección del arbolado frente a posibles afecciones externas. De manera complementaria, y en el marco de la A4.6, se realizó el seguimiento continuo de la evolución de las actuaciones llevadas a cabo, permitiendo valorar el estado general de la plantación, detectar incidencias de forma temprana y adoptar las medidas correctoras oportunas para garantizar el éxito de la restauración forestal emprendida.



Imagen 4.1 Seguimiento de la plantación.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*



Imagen 4.2 Reposición de marras.



Imagen 4.3 Estado general de la plantación.

Bosques Flotantes *cuenta con el apoyo de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia (PRTR), financiado por la Unión Europea - NextGenerationEU.*

En términos generales, la ejecución de la acción A4 puede valorarse de manera satisfactoria, habiéndose cumplido los objetivos planteados tanto en lo relativo a la adquisición y acondicionamiento de la parcela como a la implantación del nuevo modelo forestal.

Los indicadores de supervivencia registrados durante las visitas de seguimiento reflejan tasas de prendimiento elevadas en el conjunto de las especies plantadas, con un desarrollo vegetativo acorde a las condiciones fenológicas esperadas para la zona y la época de plantación. La simbiosis micorrícica establecida entre el sistema radicular de los plantones y los hongos inoculados evidencia un correcto proceso de colonización, lo que augura una mayor resiliencia del arbolado frente a condiciones de estrés hídrico y edáfico. Todo ello permite concluir que la restauración forestal se encuentra en una trayectoria ecológica positiva, sentando las bases para la consolidación progresiva de un ecosistema forestal autóctono funcional, biodiverso y adaptado a los escenarios climáticos futuros previstos para el área de actuación.