

# MICORRIZACIÓN CONTROLADA DE *PINUS HALEPENSIS* EN VIVERO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INÓCULO Y TÉCNICAS DE CULTIVO

M. HONRUBIA, G. DÍAZ Y A. GUTIÉRREZ

DEPTO. BIOLOGÍA VEGETAL. FAC. BIOLOGÍA. UNIV. MURCIA. CAMPUS ESPINARDO, 30100 MURCIA.

## RESUMEN

Con el fin de mejorar la calidad de la planta para reforestación se ha llevado a cabo un experimento en vivero donde se utilizan diferentes métodos de inoculación con hongos ectomicorrícicos. Para ello, se inocularon plántulas de *Pinus halepensis* de 3 meses producidas en contenedor mediante dos técnicas culturales que diferían en el sustrato, contenedor, y labor de siembra y repicado. Los hongos utilizados fueron *Rhizopogon roseolus*, *R. rubescens* var. *ochraceous*, *Suillus mediterraneensis* y *Pisolithus tinctorius*. De cada hongo se preparó micelio en sustrato sólido (turba-vermiculita), suspensiones miceliarias, y micelio incluido en un gel de alginato. En el caso de *P. tinctorius* se utilizaron también suspensiones de esporas. Para cada uno de los tratamientos se evaluó: tasa de micorrización (número de plantas micorrizadas), porcentaje de micorrización (número de raíces cortas micorrizadas) y otros parámetros de crecimiento de la planta. El micelio en turba-vermiculita resultó un inóculo muy efectivo para *P. tinctorius*, mientras que el alginato o las suspensiones miceliarias no lo fueron. Sin embargo, las perlas de alginato fueron un inóculo apropiado para *S. mediterraneensis* y *R. rubescens*. Los resultados obtenidos permitirán optimizar el uso de inóculo ectomicorrícico con *P. halepensis* en vivero.

P.C.: *Pinus halepensis*, ectomicorrizas, inoculación, plántulas en contenedor

## SUMMARY

In order to improve the quality of seedlings for reforestation purposes, an experiment with different inoculation techniques has been carried out in nursery. 3-month-old *Pinus halepensis* seedlings were produced using different substrate, type of container, and sowing and transplanting method. Mycelial inoculum on solid substrate (peat-vermiculite), mycelial slurries and mycelium entrapped in alginate beads were produced for *Rhizopogon roseolus*, *R. rubescens* var. *ochraceous*, *Suillus mediterraneensis* and *Pisolithus tinctorius*. Moreover, spore suspensions of *P. tinctorius* were also prepared for inoculation. The mycorrhization rate (number of mycorrhizal plants), the percentage of mycorrhization (number of mycorrhizal roots) and several growth parameters were determined for each treatment. Mycelium on peat-vermiculite was a very effective inoculum for *P. tinctorius*, whereas alginate beads or mycelial slurries were ineffective. However, alginate beads was a suitable type of inoculum for *S. mediterraneensis* and *R. rubescens*.

K.W.: *Pinus halepensis*, containerized seedlings, ectomycorrhizas, inoculation

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, no existe ninguna duda respecto a que las micorrizas son una parte esencial del ecosistema forestal y tienen un potencial real de aplicación en los programas forestales de todo el mundo. El principal objetivo que se persigue con la inoculación de plántulas en vivero mediante hongos ectomicorrícicos es mejorar el desarrollo de estas plántulas y aumentar su supervivencia en campo.

Para la mayoría de las especies vegetales existe un amplio abanico de potenciales hongos ectomicorrícicos (Honrubia *et al.*, 1992). Determinadas especies fúngicas, e incluso cepas de una misma especie, producen efectos distintos sobre el crecimiento de la planta en distintas condiciones ecológicas (Perry *et al.*, 1987). Por tanto, uno de los pasos más importantes en todo programa de inoculación en vivero es la selección del hongo ectomicorrícico (Trappe, 1977). Igualmente deben tenerse en cuenta otras características, como requerimientos de temperatura, tolerancia a la sequía, tolerancia a la toxicidad del suelo, rango de pH, etc., de acuerdo con los objetivos marcados.

El momento en el que se introduce el inóculo parece ser, también, un factor importante a la hora de obtener mejores resultados en la micorrización (Boyle *et al.*, 1987). Se han realizado muchos experimentos de inoculación de coníferas con ectomicorrizas, en los que se han utilizado diversos métodos de inoculación, mediante basidiósporas (Castellano *et al.*, 1985), cultivos en turba-vermiculita (Mortier *et al.*, 1988), suspensiones miceliarias (Danielson *et al.*, 1984) y micelio encapsulado en gel de alginato (Le Tacon *et al.*, 1985; Mortier *et al.*, 1988), aunque no se han realizado experiencias de este tipo con *Pinus halepensis*.

Los objetivos de este trabajo son, por un lado, comparar el tipo de inóculo en cuatro especies de hongos ectomicorrícicos: *Rhizopogon roseolus*, *R. rubescens* var. *ochraceous*, *Suillus mediterraneensis* y *Pisolithus tinctorius* y por otro, estimar las diferencias entre dos técnicas culturales distintas.

## MATERIAL Y METODOS

El experimento se ha llevado a cabo en los viveros del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia. Se han considerado tres factores: especie fúngica, con cuatro tratamientos ensayados, tipo de inóculo, con cuatro tratamientos, y técnica de cultivo, con dos.

Los hongos utilizados fueron *R. roseolus*, *R. rubescens* var. *ochraceous*, *S. mediterraneensis* y *P. tinctorius*, recolectados en Moratalla (Murcia) en sustrato calizo y bajo *P. halepensis*. Los aislamientos se realizaron a partir de carpóforo en medio MMN con agar (medio Melin-Norkrans modificado, Marx, 1969). De cada hongo se prepararon tres tipos de inóculo micorrícico: a) Micelio producido en un sustrato formado por una mezcla 1:4 (v/v) de turba-vermiculita, saturada con medio MMN líquido. Aplicado a una dosis 1/4 en relación al volumen del sustrato del contenedor. b) Micelio producido en medio MMN líquido, y después filtrado, homogeneizado y resuspendido en solución salina al 2%. Aplicado a una dosis de 10 ml/planta. c) Micelio producido en medio líquido y después incluido en un gel de alginato según la técnica descrita por Le Tacon *et al.* (1985). Aplicado a una dosis de 16 ml/planta. d) Además, para *P. tinctorius* se utilizó una suspensión acuosa de esporas obtenida a partir de esporocarpos que se aplicó a una dosis de  $10^{10}$  esporas/planta.

La producción de las plantas se realizó a partir de semillas de *Pinus halepensis*, lavadas en agua corriente y esterilizadas con  $H_2O_2$  30 vol. durante 30 min. Se utilizaron dos técnicas

de cultivo diferentes. Técnica de cultivo A: Se utilizaron contenedores Poliforest de poliestireno expandido, con alveolos de plástico de 350 cc de capacidad que se llenaron con un sustrato esterilizado 3 veces (115 °C, 60 min.) consistente en una mezcla 2:1:1 de turba rubia, turba negra y perlita+vermiculita. Las semillas se sembraron directamente en el contenedor y las plántulas se clarearon a 1 por alveolo después de la germinación. La inoculación se realizó tres meses después de la germinación por incorporación directa del inóculo micorrízico sobre la superficie del sistema radical en el caso del inóculo en sólido y en alginato, por inyección para el inóculo líquido y por aplicación en la superficie para la suspensión de esporas. Técnica de cultivo B: Se utilizaron contenedores Forespot de plástico de 250 cc de capacidad. El sustrato esterilizado 3 veces (115 °C, 60 min) consistió en una mezcla 6:2:1:1 (v/v) de turba rubia, turba negra, vermiculita y arena. Las semillas se sembraron en bandejas semillero y las plántulas se repicaron en el momento de la inoculación, momento en el que se realizó el clareo, dejando 1 planta por alveolo. Las plantas se inocularon a los 3 meses después de la germinación, por incorporación al sustrato del inóculo micorrízico en una banda a unos 5-7 cm de profundidad en el momento del llenado de los contenedores, para el caso del inóculo en sólido y en alginato, por inyección para el inóculo líquido y por aplicación en la superficie para la suspensión de esporas.

Tres meses después de la inoculación se examinó de forma no destructiva el sistema radical de todas las plantas. Se determinó la tasa de micorrización, expresada como porcentaje de plantas micorrizadas. El porcentaje de micorrización o de raíces cortas micorrizadas se determinó mediante un índice subjetivo de 0 a 5: 1: 1-20%; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; 5: 81-100%. Cinco meses después de la inoculación se cuantificaron algunos parámetros morfológicos de crecimiento de la planta: altura, diámetro del cuello y número de ramificaciones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y las diferencias significativas entre tratamientos se establecieron mediante el test de Newman.

## RESULTADOS

Los cuatro hongos ectomicorrízicos ensayados dieron lugar a la formación de micorrizas características cuando se utilizó la técnica de cultivo A (Tabla 1). En cambio, con la técnica de cultivo B, con distinto sustrato, labor de siembra y repicado, estos mismos hongos fueron incapaces de formar ectomicorrizas, excepto en el caso de *P. tinctorius* (Tabla 2), donde aún así los niveles de micorrización fueron menores. En cuanto a la efectividad de los distintos inóculos utilizados puede decirse que varía según la especie fúngica. En el caso de *P. tinctorius*, mientras que la turba-vermiculita fue el inóculo más eficaz, el micelio incluido en alginato o la suspensión miceliar no formó micorrizas. Asimismo, la inoculación con esporas sí resultó efectiva (Tablas 1 y 2). Para el resto de los hongos, en cambio, se obtuvieron buenos niveles de micorrización con alginato y algo menores, aunque aceptables, con sólido. Las suspensiones miceliar fueron algo menos eficaces, especialmente para *Rhizopogon* (Tabla 1).

En cuanto a los parámetros de crecimiento de las plantas, no se observaron diferencias significativas ni entre las dos técnicas de cultivo utilizadas ni entre los hongos ectomicorrízicos ensayados (Tabla 3).

## DISCUSION

De los resultados obtenidos se deduce que la selección de una técnica de producción de la planta apropiada para favorecer la micorrización es de gran importancia cuando el objetivo que se persigue es la obtención de planta micorrizada en vivero. En el experimento

realizado, la falta de eficiencia de los hongos e inóculos utilizados en la técnica de cultivo B se debe atribuir, más que a una sola causa, a un conjunto de factores. Por un lado, el sustrato utilizado, con menor cantidad de perlita y vermiculita y más arena parece producir un sistema radical menos desarrollado, con menos raíces secundarias y por tanto menor predisposición a la micorrización, además de un cepellón poco consistente. Por otro lado, el repicado tardío desde el semillero, dadas las características de crecimiento del pino carrasco, podría afectar negativamente al desarrollo del sistema radical. Por último, el contenedor utilizado en la técnica A protege al micelio de los cambios bruscos de temperatura, conserva mejor la humedad y permite una mejor manipulación de los inóculos en el momento en el que el desarrollo de la planta es el más adecuado para la micorrización.

*P. tinctorius* es el hongo que mostró una mejor capacidad colonizadora en todas las condiciones ensayadas, obteniéndose incluso niveles del 100% de planta micorrizada con inóculo miceliar en sustrato sólido, lo que lo convierte en un hongo muy apropiado para inoculación en vivero. Aunque la eficiencia de este hongo en vivero se ha demostrado ampliamente con otras especies vegetales (Alvarez y Trappe, 1983; Marx y Bell, 1985; Marx *et al.*, 1989; Pera *et al.*, 1993) y con *P. halepensis* inoculados con suspensiones esporales (Torres y Honrubia, 1994) no existen datos previos de la formación de micorrizas con *P. halepensis* a partir de inóculo miceliar. La utilización de suspensiones esporales dió también buenos resultados, sobre todo teniendo en cuenta la facilidad de manipulación y aplicación de este tipo de inóculo. El micelio incluido en un gel de alginato resulta también un método apropiado para la inoculación en vivero de hongos como *Suillus* y *Rhizopogon*, y no lo parece, sin embargo para *P. tinctorius*. Esta forma de inóculo se ha demostrado eficaz previamente para *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *Hebeloma cylindrosporum*, *H. crustuliniforme* (Le Tacon *et al.*, 1985; Mauperin *et al.*, 1987, Mortier *et al.*, 1988; Pera, 1992; Parladé *et al.*, 1993), mientras que estudios previos indican su ineficacia para *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon subaerolatus*, *R. roseolus* (Pera, 1992; Parladé *et al.*, 1993). Probablemente, la diferente sensibilidad a la fragmentación necesaria para la producción de este inóculo o problemas en su supervivencia sean las causas de diferencias en efectividad entre especies fúngicas. Algo similar parece ocurrir con las suspensiones miceliar. Brown y Sinclair (1981), Danielson *et al.* (1984), Boyle *et al.* (1987) ya utilizaron este tipo de inóculo con éxito para diversos hongos, mientras que *P. tinctorius* fue incapaz de formar micorrizas. La utilización de suspensiones miceliar presenta muchas ventajas frente a otros tipos de inóculo. Puede ser introducido en cualquier estadio de la producción de la planta, cuando el desarrollo del sistema radical presenta ya las raíces receptoras a la micorrización, es más rápido y manejable de producir y de aplicar que otros tipos de inóculo y sobre todo, por su uso potencial en la inoculación a media-gran escala en condiciones de vivero. Aunque los niveles de plantas micorrizadas obtenidos en nuestro experimento son bajos, quizá una optimización de las condiciones de producción del inóculo o mayores dosis de aplicación permitan mejorar los resultados.

Las plantas producidas por ambas técnicas de cultivo presentaron, en general, buenos parámetros de crecimiento, adecuados para los objetivos de reforestación, sin grandes diferencias significativas. Sin embargo, conviene seleccionar una técnica que favorezca la micorrización de las especies fúngicas que se utilizan.

## BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ I.F. AND TRAPPE J.M. (1983). Effects of application rate and cold soaking pretreatment of *Pisolithus* spores on effectiveness as nursery inoculum on western conifers. *Can. J. For. Res.* 13: 533-537

BOYLE C.D., ROBERTSON W.J. AND SALONIUS P.O. (1987). Use of mycelial slurries of mycorrhizal fungi as inoculum for commercial tree seedlings nurseries. *Can. J. For. Res.* 17: 1480-1486

BROWN A.C. AND SINCLAIR W.A. (1981). Colonization and infection of primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *For. Sci.* 27: 111-124

CASTELLANO M.A. AND TRAPPE J.M. (1985). Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas-fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. *Can. J. For. Res.* 15: 613-617

DANIELSON R.M., VISSER S. AND PARKINSON D. (1984). The effectiveness of mycelial slurries of mycorrhizal fungi for the inoculation of container-grown jack pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 14: 140-142

HONRUBIA M., TORRES P., DÓAZ G. Y CANO A. (1992). *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUCDEME VIII. Monograf. 54.45 pp.

LE TACON F., JUNG G., MUGNIER J., MICHELOT P. AND MAUPERIN C. (1985). Efficiency in a forest nursery of ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentator and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.* 63: 1664-1668

MARX D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.* 59: 153-163

MARX D.H. AND BELL W. (1985). Formation of *Pisolithus* ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings with spores pellet inoculum applied at different times. *USDA For. Res.* SE-249, 7p.

MARX D.H., CORDELL C.E., MAUL S.B., RUEHLE J.L. (1989). Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedlings nurseries. II. Efficacy of various vegetative and spore inocula. *New Forest* 3: 57-66

MAUPERIN C., MORTIER F., GARBAYE J., LE TACON F. AND CARR G. (1987). Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gels. *Can J. Bot.* 65: 2326-2329

MORTIER F., LE TACON F. AND GARBAYE F. (1988). Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas-fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Ann. Sci. For.* 45 (4):301-310

PARLAD... X., PERA J. Y ALVAREZ I.F. (1993). Técnicas de inoculación de plantas de repoblación con hongos ectomicorrícicos seleccionados. *Congreso Forestal Español*. Lourizan. 1993. Ponencias y comunicaciones. Tomo II: 385-389

PERA J., 1992. Selección de hongos ectomicorrícicos para *Pinus pinaster* Ait para su aplicación en reforestación. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

PERRY D.A., MOLINA R. AND AMARANTHUS M.P. (1987). Mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. *Can. J. For. Res.* 17: 929-940

TORRES P. AND HONRUBIA M. (1994). Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. *Ann. Sci. For.* 51: 521-528

TRAPPE J.M. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 203-222

Especie fúngica	Tipo de inóculo	Tasa micorrización	Índice micorrización*
		(% plantas micor.)	(raíces micorrizadas)
<i>R. roseolus</i>	Suspensión miceliar	14,8	3,8
	Alginato	-	-
	Turba-vermiculita	20	3,8
<i>R. rubescens</i>	Suspensión miceliar	10,9	2,8
	Alginato	50,1	2,5
	Turba-vermiculita	10,7	1,5
<i>S. mediterraneensis</i>	Suspensión miceliar	22,0	2,9
	Alginato	78,4	4,1
	Turba-vermiculita	41,8	4,5
<i>P. tinctorius</i>	Suspensión miceliar	0	0
	Alginato	3,6	1,5
	Turba-vermiculita	100	4,1
	Esporas	75	2,4

\* Índice de 0-5. 1: 1-20%; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; 5: 81-100%

Tabla 1. Resultados de las inoculaciones con la técnica de cultivo A.

Especie fúngica	Tipo de inóculo	Tasa micorrización	Índice micorrización*
		(% plantas micor.)	(raíces micorrizadas)
<i>R. roseolus</i>	Suspensión miceliar	--	--
	Alginato	--	--
	Turba-vermiculita	0	0
<i>S. mediterraneensis</i>	Suspensión miceliar	0	0
	Alginato	0	0
	Turba-Vermiculita	0	0
<i>P. tinctorius</i>	Suspensión miceliar	0	0
	Alginato	0	0
	Turba-vermiculita	62,5	2
	Esporas	7,9	1,9

\* Índice de 0-5. 1: 1-20%; 2: 21-40%; 3: 41-60%; 4: 61-80%; 5: 81-100%

Tabla 2. Resultados de las inoculaciones con la técnica de cultivo B.

Especie fúngica	Altura (cm)	Nº ramificaciones	Ø cuello (mm)
Técnica cultivo A			
<i>R. roseolus</i>	12,4 a	6,9 ab	22,4 ab
<i>R. rubescens</i>	12,8 a	7,4 ab	22,2 a
<i>S. mediterraneensis</i>	13,4 a	7,4 ab	22,3 a
<i>P. tinctorius</i>	12,9 a	6,6 ab	25,5 bc
Control	10,9 a	6,3 a	22,5 ab
Técnica cultivo B			
<i>R. roseolus</i>	-	-	-
<i>S. mediterraneensis</i>	-	-	-
<i>P. tinctorius</i>	14,1 a	7,8 bc	27,5 c
Control	13,4 a	8,1 c	22,9 ab

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes según el test de Newman.

Tabla 3. Parámetros morfológicos de crecimiento en plantas micorrizadas