INOCULACIÓN CON ESPORAS DE *INOCYBE* SP. PARA POSTURAS DE *PINUS CARIBAEA* VAR. *CARIBAEA*

Anairad Ferrer Grau,[1] Sara Herrera Figueroa,[2] Teresa Cabrera Nevot[2] y Lourdes Gómez[1]

[1] Instituto de Investigaciones Forestales (IIF). Calle 174 no. 1723 e/ 17B y 17C, Rpto. Siboney, Playa, La Habana, Cuba.
[2] Instituto de Ecología y Sistemática (IES). Carretera de Varona Km 3½, Capdevila, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se estudió la influencia de diferentes fuentes de inóculo ectomicorrizógeno sobre el crecimiento de posturas de Pinus caribaea *var.* caribaea. *Las variantes experimentales consistieron en inóculo estéril, micorriza natural de suelo de pinar y esporas de* Inocybe *sp. Los valores promedio superiores de diámetro, peso seco foliar y radical de las posturas correspondieron a la aplicación con esporas de* Inocybe *sp., aunque no hubo diferencias significativas para la infección micorrizógena entre las fuentes de inoculación. Se recomienda la inoculación con esporas de* Inocybe *sp. como fuente alternativa para obtener una simbiosis ectomicorrizógena que proporcionará beneficios para el desarrollo y establecimiento de* Pinus caribaea *var.* caribaea *en el país.*

ABSTRACT

The influence of different sources of ectomycorrhizal inoculum on the growth of seedlings of Pinus caribaea *var.* caribaea *was studied. The researched variants included: sterile inoculum, natural mycorrhiza from soil beneath under plantations and spores of* Inocybe *sp. The higher average values of the diameter as well as leaf and root dry weight of the seedlings were obtained as result of the application of spores of* Inocybe *sp. although there were not significant differences for the mycorrhizal infection among the inoculation sources. The inoculation with spores of* Inocybe *sp. as alternative source in order to obtain an ectomycorrhizal symbiosis that should provided benefits for the development and establishment of* Pinus caribaea *var.* caribaea *within the country is recommended.*

INTRODUCCIÓN

Los representantes de la familia Pinaceae no pueden crecer y desarrollarse normalmente sin la presencia adecuada en el suelo de especies ectomicorrizógenas que formen la simbiosis con el sistema radical de las plantas, por lo que es necesario la inoculación de estos microorganismos aplicados en forma de esporas, micelio vegetativo o suelo de pinar (incluye estos propágulos micorrizógenos, además

de raíces micorrizadas), y que a su vez revisten gran importancia en la nutrición vegetal de las plantas [Castellano, 1994; Brundrett *et al.*, 1996].

En Cuba, hasta el momento, se utiliza suelo de pinar como fuente de inóculo micorrizógena en los viveros de coníferas, aunque en otros países se introducen esporas de diferentes especies ectomicorrizógenas que han brindado resultados satisfactorios para la micorrización y crecimiento de *Pinus* sp. [Torres y Honrubia, 1994; Parlade *et al.,* 1996].

Debido a la existencia en los pinares cubanos de especies ectomicorrizógenas y donde además sus esporas pueden ser aplicadas como fuente de inóculo, es que nos propusimos investigar la eficacia de la inoculación con esporas de *Inocybe* sp. como fuente alternativa para la micorrización y crecimiento de *Pinus caribaea* var. *caribaea.*

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó con *Pinus caribaea* var. *caribaea* en el vivero de la Estación Experimental Forestal de Itabo, en la provincia de Matanzas. Los tratamientos experimentales consistieron en:

- Mezcla de suelo de pinar (10%) con suelo estéril.
- Mezcla de esporas de *Inocybe* sp. con suelo estéril.
- Suelo estéril (testigo).

El suelo fue esterilizado con bromuro de metilo a razón de 45 g/m, según el método de Marx y Bryan (1975). Los cuerpos fructíferos de *Inocybe* sp. se colectaron en los pinares establecidos de *Pinus caribaea* var. *caribaea* aledaños al sitio experimental. Para su incorporación al sustrato de crecimiento de la especie forestal se fragmentaron los cuerpos fungosos y se extrajeron las esporas, las cuales fueron suspendidas en agua y aplicadas en cantidades de 2 mg de esporas/bolsa, con una concentración de 10^6 determinada en un hematocitómetro de Newbauer.

Transcurridos siete meses de crecimiento de *Pinus caribaea* var. *caribaea,* se escogieron al azar 10 posturas por tratamiento y se evaluaron los siguientes indicadores:

- Altura final (cm).
- Diámetro al cuello de la raíz (mm).
- Peso seco foliar y radical (g).
- Infección ectomicorrizógena (%), que consistió en examinar el sistema radical total de las posturas para estimar el porcentaje de infección en las raíces cortas, según la escala propuesta por Marx *et al.* (1991).

La significación de las diferencias entre los tratamientos se determinó mediante análisis de varianza completamente aleatorizado, y se utilizó el test de clasificación múltiple de Tukey $(P \leq 0{,}05)$ para la comparación de las medias. Los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación de los datos, antes de someterlos al análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la tabla, las plántulas inoculadas con esporas de *Inocybe* sp. y suelo de pinar no difirieron significativamente en los valores promedio de altura e infección ectomicorrizógena; sin embargo, se detectaron resultados superiores en diámetro y peso seco foliar y radical con la aplicación de esporas de *Inocybe* sp. que difirieron significativamente de los otros dos tratamientos experimentales: suelo de pinar y testigo.

Evaluación de los caracteres de crecimiento y micorrización para posturas de siete meses de edad de *Pinus caribaea* var. *caribaea*

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Peso seco foliar (g)	Peso seco radical (g)	Infección micorrícica (%)
Esporas de *Inocybe* sp.	17,96a	2,53a	5,61a	1,81a	69,0a
Suelo de pinar	17,36a	2,16b	4,23b	0,93b	67,5a
Suelo estéril	12,50b	1,10c	0,95b	0,28b	41,7b

Valores promedio dentro de una misma columna con distintas letras difieren significativamente para Tukey (5%).

El porcentaje de micorrización encontrado en el testigo, a pesar de la esterilización del suelo, fue debido a la diseminación de los propágulos ectomicorrizógenos por medio de la lluvia y el viento, y también quizás a animales que incidieron en el momento de la realización del experimento. La verificación de la esterilidad del suelo se realizó a nivel de laboratorio, donde estos factores se aislaron y la simbiosis fue nula.

Marx *et al.* (1991) relacionan los caracteres de crecimiento con el efecto de la micorrización. Tal es el caso en los pesos secos foliares y radicales que son muy sensitivos a la introducción de especies micorrizógenas; por el contrario, en la altura deben obtenerse resultados similares cuando las posturas se inoculan o no. Por su parte, el diámetro es un indicador que refleja diferencias entre las distintas fuentes de inóculo adicionadas en el suelo de crecimiento de la especie vegetal al ser más notable en aquellas posturas no micorrizadas. Por ello es necesario determinar el porcentaje de infección micorrizógena que, junto con el incremento de biomasa de las posturas, nos indica cuál es la fuente de inóculo más promisoria para garantizar la calidad de las pos-

turas en el vivero y el establecimiento en el campo.

En nuestro experimento podemos afirmar que la inoculación con esporas es más efectiva e infectiva que el suelo de pinar debido a los resultados mostrados en la *Tabla 1*. Marx *et al*. (1991), Pera *et al.* (1994) y Parlade *et al.* (1996) han demostrado la eficacia de esta fuente de inóculo con diversas especies ectomicorrizógenas sobre el crecimiento de *Pinus* sp. y *Pseudotsuga menziessi*.

Debemos aclarar que aunque este ensayo se realizó con *Inocybe* sp., en el mundo existen alrededor de cinco mil o seis mil especies ectomicorrizógenas, en su mayoría Basidiomycetes y Ascomycetes, que pueden asociarse simbióticamente a *Pinus* sp., *Quercus* sp., *Eucalyptus* sp. y *Casuarina* sp., fundamentalmente, por lo que sería conveniente realizar inventarios y estudios de dinámica poblacional de las especies ectomicorrizógenas en los bosques y plantaciones para poder explotar estos microorganismos como biofertilizantes.

Los autores que reportan investigaciones e inclusive la comercialización de especies ectomicorrizógenas, con el objetivo de utilizarlas en los viveros como fuente de inóculo en forma de esporas, buscan aquellas especies que producen abundantes esporocarpos, y si es posible con numerosas estructuras maduras (esporas), las cuales son requeridas para la colonización de las raíces, como por ejemplo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y *Scleroderma* sp. [Marx *et al.,* 1991; Brundrett *et al.,* 1996]. Observaciones personales han posibilitado la detección de estas dos especies ectomicorrizógenas en algunos pinares y plantaciones de *Eucalyptus* sp. en Cuba durante un tiempo prolongado en diferentes meses del año, ya que no siempre las especies fungosas fructifican en el momento que se quiera para proceder a la inoculación y, por tanto, se hace necesario estudiar la viabilidad de las esporas en diferentes tiempos de almacenamiento.

En el momento en que se realizó la colecta, *Inocybe* sp. se presentó abundantemente, aunque no es una especie que se reporte para esta finalidad por otros autores, debido quizás a su inexistencia o irregularidad en las plantaciones o bosques de otros países, lo que puede limitar su aplicación masiva para la reforestación de las especies que se asocian a ella. Castellano (1994), Chalermpongse (1995) y Brundrett *et al.* (1996) resumen los beneficios y perjuicios de cada una de las diversas fuentes de inóculo ectomicorrizógeno. Por citar algunas, exponemos las siguientes:

- Cuando se inocula con esporas, estas permiten la introducción más segura de la especie que se desea como cepa pura, algunas de ellas recomendadas por sus altos rendimientos y fácil manejo (peso y volumen) en el vivero; pero debe conocerse el ciclo de vida de la especie fungosa con el objetivo de disponer de cantidades suficientes para la inoculación, de lo

contrario habrá que probar la viabilidad de las esporas en tiempo y condiciones de almacenamiento.
- Cuando se inocula con suelo de pinar se tiene el inconveniente de no conocer cuál o cuáles son las especies ectomicorrizógenas que se inoculan, ni hay certeza de que el inóculo contendrá la especie más deseable para la especie vegetal que se producirá en el vivero y que será transplantada al sitio definitivo; además, existen dificultades de transportación y desconocimiento de los posibles patógenos acarreados al extraer grandes volúmenes de tierra del pinar, aunque esta fuente puede garantizar la micorrización si el inóculo nativo es afín al huésped.

CONCLUSIONES

- Las posturas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* correspondientes a los tratamientos de inoculación ectomicorrizógena mostraron índices de crecimiento y micorrización superiores al testigo.
- Con la adición de esporas de *Inocybe* sp. y suelo de pinar se obtuvieron valores similares de altura e infección ectomicorrizógena.
- La inoculación con cepas puras de *Inocybe* sp. produjo aumentos significativos en diámetro, peso seco foliar y radical con respecto al suelo de pinar y al testigo.
- Una vez estudiada la dinámica poblacional de *Inocybe* sp. se propone la inoculación con esporas de *Inocybe* sp. como fuente alternativa para la micorrización y crecimiento de *Pinus caribaea* var. *caribaea* en viveros del país.

BIBLIOGRAFÍA

BRUNDRETT, M.; N. BOUGHER; B. DELL; T. GROVE; N. MALAJCZUCK: *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*, ACIAR Monograph 32, 1996.

CASTELLANO, M.: «Current Status of Outplanting Studies Using Ectomycorrhiza-Inoculated Forest Trees», *Mycorrhizae in Plant Health*, The American Phytopathological Soc., St. Pauly, 1994, pp. 261-281.

CHARLERMPONGSE, A.: «The Ocurrence and Use of Ectomycorrhizal Fungi in Eucalipt Plantations in Thailand», *Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia*, ACIAR Proceedings no. 62, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 1995, pp. 127-131.

MARX, D. H.; W. C. BRYAN: «Growth and Ectomycorrhizal Development of Loblolly Pine Seedlings in Fumigated Soils Infested with the Fungal Symbiont *Pisolithus tinctorius*», *Forest Sci.* 21: 245-254, 1975.

MARX, D. H; J. L. RHUELE *ET AL.*: «Methods for Studying Nursery and Field Response of Trees to Specific Ectomycorrhiza», *Methods in Microbiology*, vol. 23, chapter 17, Academic Press, Londres, 1991, pp, 383-411.

PARLADE, J.; I. ÁLVAREZ *ET AL.*: «Ability of Native Ectomycorrhizal Fungi from Northern Spain to Colonize Douglas-Fir and Other Introduced Conifers», *Mycorrhiza* no. 6:51-55,1996.

PERA, J.; J. PARLADE *ET AL.*: «Eficacia del tipo de inóculo de *Pisolithus tinctorius* en la formación de micorriza en *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziessii*», *INIA*, vol. 3(1):19-29, 1994.

TORRES, P.; M. HONRUBIA: «Inoculation of Containerized *Pinus halapensis* (Miller) Seedlings with Basidiospores of *Pisolithus arrhizus* (Pers.) Raushert, *Rhizopogon roseolus* Th. M. Fr. and *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze», *Ann. Sci. For*. 51:521-528, 1994.