

INFLUENCIA DE LA FERTIRRIGACION EN LA MICORRIZACION CONTROLADA DE *PINUS HALEPENSIS* EN VIVERO.

M. HONRUBIA*, C. CARRILLO*, J. PEÑUELAS**, S. DOMÍNGUEZ**, P. VILLAR** Y L. OCAÑA**.

* DPTO. BIOLOGÍA VEGETAL. LAB. MICOLOGIA-MICORRIZAS. FAC. BIOLOGÍA UNIV. MURCIA. CAMPUS ESPINARDO. 30100 MURCIA.

** CENTRO NACIONAL DE MEJORA FORESTAL "EL SERRANILLO". CTRA. FONTANAR, KM 2. 19080 GUADALAJARA.

RESUMEN

Se ha realizado una experiencia para conocer la influencia de tres tipos de fertilización y dos intensidades de riego en la micorrización controlada de *Pinus halepensis*, con dos cepas de *Pisolithus tinctorius*. Para ello, se han inoculado plántulas de 4 meses de *Pinus halepensis* producidas en contenedor. El inóculo se ha obtenido por fermentación en sustrato sólido (turba y vermiculita, 1:4 v/v). Se han ensayado tres tipos de fertilización que difieren en su concentración en fósforo y nitrógeno. Los dos tipos de riego varían en el grado de aireación en el sustrato. En cada uno de los tratamientos se ha evaluado el porcentaje de micorrización, el de infección de los sistemas radicales, parámetros morfológicos de la planta y también análisis de nutrientes foliares.

P.C.: Fertirrigación, ectomicorriza, *Pinus halepensis*, *Pisolithus tinctorius*.

SUMMARY

An experiment has been carried out in order to know the influence of three fertilization regimes and two watering intensities on the mycorrhization of *Pinus halepensis* seedlings. For this purpose, 4-month-old containerized seedlings have been inoculated with two *Pisolithus tinctorius* strains. The mycorrhizal inocula have been produced by fermentation on solid substrate (1:4 peat-vermiculite v/v). Three different P and N concentration have been essayed. The two watering regimes were different in the substrate aeration levels. For each treatment, the percentage of mycorrhization, percentage of mycorrhizal short roots, growth parameters and plant nutrient analysis have been determined.

K.W.: Fertirrigation, ectomycorrhiza, *Pinus halepensis*, *Pisolithus tinctorius*.

INTRODUCCION

Muchas de las prácticas culturales utilizadas comúnmente en vivero inhiben el desarrollo de micorrizas en las plántulas. Varios experimentos, en los que se compararon diferentes niveles de fertilización en plántulas producidas en contenedor, muestran que la formación de micorrizas está relacionada con los niveles de N y P añadidos al cultivo (Danielson *et al.*, 1984; Ruelhe y Wells, 1984; Castellano *et al.*, 1985).

Un adecuado ajuste de los niveles de fertirrigación es esencial para obtener plántulas con un desarrollo equilibrado entre parte aérea y radical y que permita además conseguir un alto

porcentaje de micorrización. Para ello, es importante acotar estos niveles tanto para la especie vegetal utilizada, como para las fúngicas.

Numerosos trabajos muestran que altas concentraciones de N en el sustrato, inhiben el desarrollo de ectomicorrizas (Ruelhe, 1980; Dixon *et al.*, 1985; Beckjord *et al.*, 1985; Holopaintent y Heinonen-Tanski, 1993).

La inoculación de plántulas producidas en contenedor con hongos ectomicorrícicos, se ha llevado a cabo con éxito utilizando varios tipos de inóculo. Entre ellos, inóculo producido por fermentación en sustrato sólido (Hung y Molina, 1986; Marx *et al.*, 1989; Stenstrom *et al.*, 1990).

El objetivo de este trabajo, ha sido determinar cual de los tres tipos de fertilización ensayadas, de los dos tipos de riegos aplicados, y de las dos cepas de *Pisolithus tinctorius* que hemos ensayado, permiten optimizar la producción de plantas micorrizadas en vivero.

MATERIAL Y METODOS.

Este experimento se ha realizado en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo". Se han utilizado semillas de *Pinus halepensis* (Miller), procedentes de El Maestrazgo-Los Serranos. Los contenedores utilizados han sido "root-trainer" con capacidad de 350 cc. El sustrato utilizado ha sido turba sin fertilizar (VAPO B0). Para cada tratamiento se han preparado dos bandejas, con un total de 80 plántulas por tratamiento.

Se han utilizado dos cepas de *Pisolithus tinctorius*, 3SR procedente de Uceda (Guadalajara), y 27AM de Moratalla (Murcia), aisladas a partir de carpóforo en medio MMN con agar modificado Melin-Norkrans (Marx 1969). El inóculo se ha obtenido por fermentación en sustrato sólido, turba y vermiculita (1:4 v/v). Para ello se han utilizado botellas de cultivo con capacidad 500 ml, humedecidas con medio líquido y autoclavadas durante 20 minutos a 120 °C. A estas botellas se le han añadido discos de agar portadores del micelio fúngico, procedentes de placas Petri con medio MMN, e incubadas durante 3 meses a 23 °C hasta que el sustrato fue colonizado por completo.

La inoculación ha tenido lugar a los 4 meses de la germinación de las semillas, directamente sobre la superficie del sistema radical. En el caso de la cepa 3SR con una dosis de 17 ml de inóculo por planta, y para la cepa 27AM 25 ml de inóculo por planta.

Se han utilizado tres tipos de fertilización en las que se diferencian las fases de germinación, crecimiento y endurecimiento; las fases primera y última han sido idénticas para los tres tratamientos. El tipo fertilización F1 es el utilizado usualmente en el vivero "El Serranillo", con un aporte total de N por planta, durante toda la campaña, de 35 mg y de P de 27 mg. El tipo F2 es una fertilización rica en N, con un aporte extra de 57,7 mg de N (en forma de nitrato amónico) por semana en la etapa de crecimiento. La fertilización F3 es rica en P, con un aporte extra de 30 cm³ de P (en forma de H₃PO₄) por semana en la etapa de crecimiento. El método de aplicación ha sido una fertirrigación con F1 para todas las plantas, y hemos añadido, entre medias de la fertirrigación y con regadera, el aporte extra de N y P para F2 y F3 respectivamente.

La diferencia entre los dos riegos se ha establecido en función de la porosidad de aireación. R1 está en torno a un 12-14% de porosidad de aireación como límite máximo, y R2 en torno al 25%. Estos valores se han elegido para que el potencial hídrico no sea limitante del crecimiento.

Se han realizado análisis de nutrientes foliares de plántulas inoculadas con las dos cepas de *Pisolithus tinctorius* y en plantas testigos. Se han tomado muestras de un sólo tipo de fertilización (F1) y sin diferenciar entre riegos. Se han obtenido los pesos secos aéreos y radicales de 12 plantas, y de ellas 3 muestras de molido, correspondiendo cada muestra al

molido de 4 plantas. Con los resultados obtenidos se ha realizado un análisis de varianza de una vía con el programa estadístico BMDP, utilizando el test de Duncan para comparaciones múltiples.

Tres meses después de la inoculación se ha determinado el porcentaje de micorrización (nº de planta micorrizada por bandeja), y de infección de los sistemas radicales de todas las plantas micorrizadas. Para calcular los porcentajes de infección hemos utilizado índices subjetivos de valoración. El porcentaje que corresponde a estos índices es: 0 (0%), 1 (0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), y 4 (75-100%).

RESULTADOS

Siete meses después de la germinación de las plántulas, se han observado diferencias notables entre los porcentajes de micorrización de la cepa 3SR, respecto de la 27AM (Tabla I). En cuanto al tipo de fertilización, los porcentajes de micorrización más bajos corresponden a F2 (fertilización rica en N), mientras que entre los tipos F1 y F3 las diferencias no son tan importantes. El tipo de riego con porcentajes de micorrización y de infección más elevados, corresponde al R2 (25% de porosidad de aireación como límite máximo) (Tabla I).

Los parámetros de crecimiento de las plantas, han mostrado diferencias significativas entre los tres tipos de fertilización y los dos de riegos. Las medias más elevadas de altura y diámetro del cuello de raíz, corresponden al tipo de fertilización F2 (Tabla II).

Respecto a los resultados de peso seco, se han obtenido diferencias significativas en el peso del sistema radical de la cepa 3SR, respecto de la 27AM y del testigo (Tabla III).

Los análisis de nutrientes foliares no han mostrado diferencias significativas entre las dos cepas y el testigo (Tabla III).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las dos cepas ensayadas han mostrado diferente comportamiento, tanto en el porcentaje de micorrización, como en el de infección, siendo siempre mayor en la cepa 3SR, independientemente del tipo de fertilización y de riego ensayados.

Los porcentajes de micorrización más bajos se han observado con el tipo de fertilización F2. Esto sugiere que altos niveles de N inhiben la micorrización, tal y como han demostrado otros autores con diferentes especies vegetales y fúngicas (Kwang y Whoa, 1988; Holopaintent y Heinonen-Tanski, 1993).

En el tipo de fertilización F1 se han encontrado los porcentajes de micorrización más altos, ya que la concentración de N es lo suficientemente elevada como para no dañar el crecimiento de la planta, y a la vez permitir un porcentaje de micorrización aceptable (Gagnon y Langlois, 1988).

El hecho de que no existan diferencias importantes en el porcentaje de micorrización con el tipo de fertilización F3, puede obedecer a que las dosis de P suplementarias aplicadas, hayan sido insuficientes para afectar al proceso de micorrización.

En cuanto a los parámetros morfológicos, aparentemente no se aprecia una pauta generalizada de las medidas de altura y cuello de raíz en función del inóculo, riego o fertilización. Se observa un ligero efecto positivo en altura y cuello de raíz en la fertilización nitrogenada (F2) en las plantas 3SR y los testigos, independientemente del tipo de riego suministrado. Este efecto no es aplicable al caso de las plantas inoculadas con 27AM, en las que hay un decrecimiento de las medias de altura de las plantas sometidas al tipo R1.

En la medida de peso seco sólo se aprecia diferencia significativa en las plántulas inoculadas con 3SR respecto de las inoculadas con 27 AM y los testigos. Sin duda, ello es debido a los mayores porcentajes de micorrización e infección de las plantas inoculadas con 3SR, que a su vez presentaron un mayor desarrollo del sistema radical.

Por último, no hay diferencias significativas en los análisis de nutrientes efectuados, que fueron realizados sólo en plantas sometidas a la fertilización F1.

A modo de conclusión, se podía apuntar que la cepa 3SR resultó más efectiva que la 27AM causando un mayor crecimiento de los sistemas radicales y que la fertilización nitrogenada, en términos generales, resultó la más efectiva en cuanto a la altura y grosor del cuello de raíz.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BECKJORD, P.R.; MELHUIH, J.H. Y MCINTOSH, M.S. 1985. Effects of nitrogen and phosphorous fertilization on growth and formation of ectomycorrhizae of *Quercus alba* and *Q. rubra* seedlings by *Pisolithus tinctorius* and *Scleroderma aurateum*. *Can. J. Bot.* 63: 1677-1680.

CASTELLANO, M.A., TRAPPE, J.M. Y MOLINA, R. 1985. Inoculation of container-grown Douglas-fir seedlings with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus* : effects of fertility and spore application rate. *Can.J. For. Res.* 15: 10- 13.

DANIELSON, R.M., GRIFFITHS, C.L. Y PARKINSON, D. 1984. Effects of fertilization on the growth and mycorrhizal development of container-grown jack pine seedlings. *For. Sci.* 30: 828-835.

DIXON, R.K.; BEHRNS, G.T.; GARRET, H.E.; COX, G.S. Y SANDER, I.L. 1985. Synthesis of ectomycorrhiza on container-grown oak seedlings. *South. J. Appl. For.* 9(2): 95-99.

GAGNON, J. Y LANGLOIS, C.G. 1988. Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization, inoculum type, and symbiont. *Can. J. For. Res.* 18: 922-929.

HOLOPAINENT, T. Y HEINONEN-TANSKI, H. 1993. Effects of different nitrogen sources on the growth of Scots pine seedlings on the ultrastructure and development of their mycorrhizae. *Can. J. For. Res.* 23: 362-372.

HUNG, L. Y MOLINA, R. 1986. Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. III. Effects of commercially produced inoculum on container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 16: 802-806.

KWANG, I.O. Y WHOA, S.P. 1988. Mycorrhizal development and growth stimulation of *Pinus thunbergii* seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius* at two soil mixtures treated with six nitrogen levels. *Jour. Korean. For. Soc.* 77(4): 361-370.

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.; CORDELL, C.E.; MAUL, S.B. Y RUELHE, 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.

RUELHE, J.L. 1980. Ectomycorrhizal colonization of container-grown northern red oak as affected by fertility. *U.S. For. Serv. Southeast. For. Exp. Stn. Res. Note* SE-297.

RUELHE, J.L. Y WELLS, C.G. 1984. Development of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on container-grown pine seedlings as affected by fertility. *For. Sci.* 30: 1010-1016.

STRENSTRÖM, E.; EK, M. Y UNESTAM, T. 1990. Variation in field response of *Pinus sylvestris* to nursery inoculation with four different ectomycorrhizal fungi. *Can. J. For. Res.* 20: 1796-1803.

CEPAS FUNGICAS					
3SR			27AM		
		% micorrización	infección	% micorrización	infección
R1	F1	50	2,6	40,83	2
	F2	32,5	2	4,16	2
	F3	50	2,3	19,16	2
R2	F1	75	3,1	34,16	2
	F2	52,5	2,8	6,66	2,7
	F3	65	2,7	42,5	2

Tabla I.- Porcentajes de micorrización y medias de infección de los sistemas radicales en función del tipo de fertilización y de riego ensayados.

		3SR		27AM		TESTIGO	
		Altura (cm)	Ø cuello (mm)	Altura (cm)	Ø cuello (mm)	Altura (cm)	Ø cuello (mm)
R1	F1	14,8ab	2,8a	15,6ab	2,8a	16,1a	3ab
	F2	19,5d	3,2b	14a	2,8a	21,4cd	3,1b
	F3	16,7c	2,9a	16,9bc	2,7a	15,6a	3,1b
R2	F1	13,82a	2,9a	14,7a	2,6a	19,2b	2,8a
	F2	16,7bc	3,1b	18,1c	3,1b	22,7d	3,1b
	F3	14,1a	2,8a	15,4ab	2,7a	20,4bc	2,9a

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativos según el test de Duncan.

Tabla II.- Parámetros morfológicos de crecimiento.

	PSA	PSR	PST	N	P	K
3SR	1,89a	1,57a	3,46a	1,26a	0,21a	1,87a
27AM	1,77a	1,34b	3,28a	1,19a	0,20a	1,83a
TESTIGO	1,94a	1,30b	3,07a	1,20a	0,20a	1,80a

Datos en la misma columna seguidos por la misma letra no son significativos según el test de Duncan.

Tabla III.- Resultados de peso seco y análisis de nutrientes foliares (sólo para tipo de fertilización F1, sin diferenciar entre riegos)