

MICORRIZACIÓN CONTROLADA DE *PINUS PINEA* EN VIVERO.

A. RINCÓN, I. ÁLVAREZ, J. PARLADÉ Y J. PERA.

INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES. CTRA.DE CABRILS S/N, 08340 CABRILS.

RESUMEN

La calidad de las plantas producidas en vivero es un factor determinante de su supervivencia una vez trasplantadas a campo. La inoculación con hongos ectomicorrícicos seleccionados mejora la calidad del sistema radical de las plantas, sin embargo la producción de planta micorrizada en vivero puede verse afectada por las distintas prácticas culturales que se apliquen. Se han realizado tres experimentos para determinar la influencia del regimen de fertilización, la composición del sustrato y la época de siembra, en el crecimiento y micorrización de *Pinus pinea* producido en contenedor. Controlando el pH y la concentración de nutrientes en el sustrato y ajustando la frecuencia y el tipo de fertilización, será posible satisfacer las necesidades nutricionales de la planta y establecer un buen grado de micorrización de su sistema radical.

P.C.: micorrizas, *Pinus pinea*, fertilización, sustrato, vivero.

SUMMARY

The quality of plants produced in nursery determines, to a high degree, their posterior survival in the field. Inoculation with selected ectomycorrhizal fungi improves the quality of the root system of seedlings in the nursery. However, the production of mycorrhizal plants may be affected by the different cultural practices applied. Three experiments have been performed to determine the influence of the fertilization regime, the composition of the substrate and the time of sowing, in the growth and mycorrhization of containerized *P. pinea*. Controlling the pH, the level of nutrients in the substrate and the frequency of fertilization, it should be possible to satisfy the nutritional requirements of the seedlings and to establish a good mycorrhizal root system.

K.W.: mycorrhizae, *Pinus pinea*, fertilization, substrate, nursery.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia y el crecimiento inicial de las plantas una vez trasplantadas a campo, depende en gran medida de la calidad fisiológica de las mismas. La calidad fisiológica de una planta se define habitualmente por características del sistema aéreo como son altura y diámetro, sin embargo el estatus del sistema radical es también muy importante. La relación simbiótica entre hongos y raíces de plantas (micorrizas) proporciona múltiples beneficios a la planta, especialmente aumentando la superficie de absorción de agua y nutrientes (Smith y Read, 1997) y protegiéndola de posibles ataques de patógenos (Marx, 1973). Por todo esto, la micorrización es un factor importante para determinar la calidad del sistema radical de la planta (Cordell et al, 1987). La obtención de planta micorrizada en contenedor, depende a su vez del manejo adecuado de distintas prácticas culturales del vivero, como son el regimen de fertilización y el sustrato de crecimiento de las plantas (Cordell y Marx,

1994). Un exceso de fertilización o un elevado pH del sustrato de crecimiento pueden influir negativamente en la formación de micorrizas (Langlois y Fortin, 1982; Castellano y Molina, 1989). El objetivo de este trabajo es determinar la influencia de la fertilización y el tipo de sustrato, en la micorrización de plantas de *P. pinea*, producidas en contenedor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas fúngicas y producción de tres tipos diferentes de inóculo. Las distintas cepas de los hongos utilizados en los experimentos que se detallan a lo largo de esta metodología, el tipo de inóculo empleado y las dosis de aplicación, se recogen en la Tabla 1.

El inóculo vegetativo se obtuvo añadiendo el micelio del hongo, previamente crecido en medio líquido Melin Norkrans (MMN) (Marx, 1969), a un sustrato formado por turba y vermiculita y suplementado con MMN líquido. El inóculo de micelio atrapado en gel de alginato se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Le Tacon et al. (1985). El inóculo de esporas de *Rhizopogon roseolus*, *R. luteolus* y *Melanogaster ambiguus*, se obtuvo a partir de la suspensión acuosa resultante de la homogeneización en agua de los esporocarpos (Castellano et al, 1985). Para *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma verrucosum*, las esporas se obtuvieron tamizando los esporocarpos secos y se aplicaron mezcladas en el sustrato de siembra con ayuda de un vector sólido (vermiculita estéril). La determinación de la concentración de esporas se realizó por recuento al microscopio con ayuda de un hematocitómetro.

Efecto del método de fertilización sobre la micorrización (Experimento 1). Durante 1995 se llevó a cabo, en condiciones de invernadero, un experimento factorial para determinar el efecto de diferentes tratamientos de fertilización sobre el crecimiento y el desarrollo de la infección en plantas de *P. pinea* inoculadas con distintas cepas fúngicas. Se compararon tres tratamientos de fertilización: no fertilizado, fertirrigación (aplicada cada 15 días) con un aporte total (mg/planta) de 36.5g de N, 12.9g de P y 34.2g de K y fertilización con osmocote (fertilizante de liberación lenta, 16-18 meses) de composición 15-9-10, NPK. La dosis de aplicación de osmocote (2.3 g/L) se calculó de modo que el aporte total de nitrógeno por planta fuera el mismo que proporcionaba el regimen de fertirrigación. A cada uno de estos tres tratamientos de fertilización, se aplicaron cinco tratamientos de inoculación: control no inoculado, *Laccaria laccata*, *P. tinctorius* (vegetativo), *P. tinctorius* (esporas) y *M. ambiguus* (Tabla 1). Cada tratamiento contaba con un total de 12 plantas. Se determinaron distintos parámetros de crecimiento como la altura, el diámetro y el peso seco de tallo y raíz, así como el porcentaje de planta infectada para cada uno de los tratamientos.

Producción de planta micorrizada en vivero en contenedor. (Experimento 2). En el otoño de 1995, se produjeron un total de 950 plantas de *Pinus pinea*, en el vivero de Forestal Catalana en Breda (Girona). Las semillas se desinfectaron superficialmente con H₂O₂ y se estratificaron a 5°C durante un mes. Las plantas se sembraron en cajas de 38 alveolos de 400 ml de capacidad. Como sustrato se utilizó una mezcla de turba y vermiculita (T/V) 1:1 (v:v) de pH 5.5. Las plantas fueron fertirrigadas regularmente cada 15 días con una solución Peter's NPK (20-7-19) suplementada con micronutrientes. Se establecieron cuatro tratamientos de inoculación: Control no inoculado, inoculado con *L. laccata*, *P. tinctorius* y *R. roseolus* (Tabla 1). En el otoño de 1996 se tomó una muestra de 10 plantas de cada tratamiento para determinar el grado de infección.

Efecto del sustrato en la producción de planta micorrizada en vivero en contenedor (Experimento 3). En la primavera de 1996, se produjeron un total de 5233 plantas de *P. pinea*, en el vivero de Forestal Catalana en Breda (Girona). Las semillas se desinfectaron superficialmente con H₂O₂ y se estratificaron a 5°C durante un mes. Las plantas se

sembraron en cajas de 38 alveolos de 400 ml de capacidad. Se utilizaron dos tipos diferentes de sustrato: una mezcla de turba y vermiculita (T/V) 1:1 (v:v) y pH 5.5 y una mezcla de turba y corteza de pino (T/C) 1:1 (v:v) y pH 8.3. Las plantas se fertirrigaron regularmente cada 15 días con una solución Peter's NPK (20-7-19) suplementada con micronutrientes. Se establecieron seis tratamientos de inoculación para cada sustrato: control no inoculado, *M. ambiguus*, *P. tinctorius*, *R. roseolus*, *R. luteolus* y *S. verrucosum* (Tabla 1). Al cabo de 8 meses de crecimiento, se recogió una muestra de 14 plantas de cada tratamiento para determinar el nivel de infección de las raíces.

En los tres experimentos descritos, el conteo de raíces cortas micorrizadas se determinó siguiendo la metodología descrita por Brundrett *et al.* (1996). Los datos obtenidos se procesaron mediante análisis de la varianza y se aplicó el test de comparación múltiple de Tukey ($P = 0.05$) para la detección de diferencias significativas entre medias. Los porcentajes de micorrización se normalizaron mediante la transformación angular de los datos ($\arcsen(x/100)^{-2}$) antes de ser sometidos al análisis estadístico. Los datos que no presentaron homogeneidad de varianza, se analizaron por medio del test de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Efecto del método de fertilización sobre la micorrización. (Experimento 1). Las plantas de *P. pinea* no inoculadas, no mostraban diferencias significativas en diámetro y peso seco radical entre los tres tratamientos de fertilización aplicados, mientras que los valores de altura y peso seco aéreo eran significativamente distintos entre el tratamiento no fertilizado y los otros dos tratamientos de fertilización (Tabla 2). A su vez, los tratamientos fertirrigado y fertilizado con osmocote no eran significativamente distintos entre sí (Tabla 2). Para todos los tratamientos de inoculación, el número de plantas micorrizadas, era mayor en las plantas no fertilizadas que en los tratamientos fertirrigado y fertilizado con osmocote (Tabla 3). El número de plantas infectadas con *P. tinctorius* (inóculo vegetativo y de esporas), fue escaso en los tres tratamientos, aunque siempre era mayor en el tratamiento no fertilizado. El efecto de los distintos hongos inoculados sobre el crecimiento de las plantas de *P. pinea* no fertilizadas, se muestra en la Tabla 4.

Producción de planta micorrizada en vivero en contenedor. (Experimento 2). Los porcentajes de planta infectada con *L. laccata*, *P. tinctorius* y *R. roseolus* en 1995 y los porcentajes de micorrización se indican en la Tabla 5. En general, las plantas de los distintos tratamientos de inoculación no mostraron diferencias significativas para los parámetros de crecimiento medidos, con respecto a las plantas control.

Efecto del sustrato en la producción en contenedor de planta micorrizada en vivero. (Experimento 3). El porcentaje de plantas infectadas en el sustrato T/V fue del 100% para todos los hongos probados, excepto para *M. ambiguus* que fue del 50% (Tabla 6). En el sustrato T/C sólo se consiguieron plantas infectadas con *R. roseolus* y *R. luteolus* (Tabla 6). Los porcentajes de micorrización de las plantas infectadas con *M. ambiguus*, *P. tinctorius*, *R. roseolus*, *R. luteolus* y *S. verrucosum*, y crecidas en sustrato T/V fueron de 31%, 58%, 83.1%, 88.1% y 65.7% respectivamente. En el sustrato T/C, los porcentajes de micorrización fueron 69.6% para *R. roseolus* y 57.5% para *R. luteolus*. Las diferencias de porcentaje de micorrización entre sustratos para cada uno de los hongos probados fueron estadísticamente significativas, excepto para *R. roseolus* (Tabla 6). Las plantas de los diferentes tratamientos de inoculación, no mostraron diferencias significativas para los distintos parámetros de crecimiento (diámetro, altura, biomasa total y relación peso seco raíz/peso seco aéreo) con respecto a las plantas control, tanto para las plantas crecidas en sustrato T/V como para las crecidas en sustrato T/C.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados del experimento 1 demuestran que, tanto el fertilizante de liberación lenta (osmocote) como el soluble, tienen un efecto similar en el crecimiento de las plantas a dosis de aplicación comparables y ambos incrementan el crecimiento de las plantas en comparación con el tratamiento no fertilizado. Sin embargo, el número de plantas infectadas obtenidas en los diferentes tratamientos de fertilización, pone de manifiesto que con todos los hongos probados los mayores porcentajes de infección se obtienen cuando la planta no recibe ningún aporte de fertilizante. Controlando la concentración de nutrientes en el sustrato y ajustando el tipo y la frecuencia de fertilización al patrón de crecimiento de la especie que se quiera producir, será posible satisfacer las necesidades nutricionales de las plantas y establecer un buen grado de micorrización del sistema radical (Langlois and Fortin, 1982).

Los porcentajes de planta infectada obtenidos en los experimentos 2 y 3, demuestran la eficacia de los diferentes sistemas de inoculación y la posibilidad de obtener planta micorrizada en siembras de otoño.

Otro de los factores clave en la producción de planta en vivero es el tipo de sustrato de crecimiento. La composición de los dos tipos de sustrato probados en el experimento 3 no ha repercutido en los distintos parámetros de crecimiento medidos, aunque se detectaban síntomas de clorosis en las plantas crecidas en el sustrato T/C posiblemente debido a una deficiencia de Fe y Mn como efecto secundario del elevado pH (Van Driessche, 1984). En cuanto a la influencia sobre la micorrización, el sustrato T/C provocaba un descenso drástico en la infección con casi todos los hongos probados, probablemente debido a su alcalinidad ya que la mayoría de los hongos inoculados son de carácter acidófilo (Hung and Trappe, 1983).

De todos los hongos probados, *R. roseolus* ha mostrado una mayor infectividad en los dos años de producción de *P. pinea*. Siempre que se demuestre previamente su eficacia en campo, la facilidad de aplicación del inóculo de este hongo y su tolerancia a la composición del sustrato hacen que se perfila como buen candidato para programas de inoculación en vivero.

Para asegurar la producción en vivero de planta micorrizada, se debería realizar un manejo integrado de los distintos factores implicados en la producción de planta, siendo de gran importancia la selección del hongo adecuado, el tipo de sustrato empleado y su pH, así como el tipo y composición del fertilizante aplicado.

La micorrización no produce generalmente diferencias de crecimiento de las plantas producidas en contenedor en la fase de vivero (Molina, 1979) como puede ser observado en los tres experimentos descritos. El estudio del efecto que los distintos hongos ejercen sobre el crecimiento de las plantas, será abordado mediante el establecimiento de plantaciones experimentales en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por la Unión Europea, Contrato AIR2-CT 94-1149.

BIBLIOGRAFÍA

BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., DELL, B., GROVE, T. AND MALAJCZUK, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph, 32. 374 pp.

CASTELLANO, M., TRAPPE, J. M. AND 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.

CASTELLANO, M. AND MOLINA, R. 1989. Mycorrhizae. En: Landis, T. D., Tinus, R. W., McDonald, S. E. and Barnett, J. P. *The Container Tree Nursery Manual*, vol 5. Agric. Handbk. 674. Washington, D. C: US Department of Agriculture, Forest Service. pp: 101-167.

CORDELL, C. E. AND MARX, D. H. 1994. Effects of nursery cultural practices on management of specific ectomycorrhizae on bareroot tree seedling. In: *Mycorrhizae and Plant Health*. Pfleger, F. L. and Linderman, R. G. (eds). APS Press, St. Paul, Minnesota.

CORDELL, C. E., OWEN, J. H. AND MARX, D. H. 1987. Mycorrhizae nursery management for improved seedling quality and field performance. Intermountain Forest Nursery Association Meeting, Oklahoma City, August 10-14.

HUNG, L. AND TRAPPE, J. M. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro. *Mycologia*, 75 (2): 234-241.

LANGLOIS, C. G. AND FORTIN, J. A. 1982. Mycorrhizal development on containerized tree seedlings. *Can. Con. Tree Seedling Symposium*.

LE TACON, F., JUNG, G, MUGNIER, J., MICHELOT, P. AND MAUPERIN, C. 1985. Efficiency in forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor 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 infections. I. Antagonism of mycorrhizal resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopatology*, 59:153-163.

MARX, D. H. 1973. Mycorrhizae and feeder root diseases. En: *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Marks, G.C y Kozlowski, T.T. (eds). Academic Press, New York, pp:351-382.

MOLINA, R. 1979. Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. *Can. J. Bot.*, 57: 1223-1228.

VAN DEN DRIESSCHE, R. 1984. In: Duryla, M. and Ladis, T. D. (eds). *Forest Nursery Manual. Production of bareroot seedlings*. Martinus Nijhoff/ W. Junk Publ. The Hague/Boston/Lancaster. pp: 63-74.

SMITH, S. E. Y READ, D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. Harcourt Brace and Company, Publishers.

Hongo	Nº de Herbario	Nº de Cultivo	Tipo de inóculo	Ensayo en que se ha empleado	Dosis de aplicación (inóculo/sustrato, v/v)
<i>Laccaria laccata</i>	270	127	Vegetativo	Experimento 1	1/20
			Alginato	Experimento 2	1/20
<i>Pisolithus tinctorius</i>	190	93	Vegetativo	Experimento 1	1/8
<i>Pisolithus tinctorius</i>	435	202	Esporas	Experimento 1	10 ⁵
<i>Pisolithus tinctorius</i>	423	193	Vegetativo	Experimento 2	1/10
<i>Pisolithus tinctorius</i>	571	-	Esporas	Experimento 3	2·10 ⁷
<i>Rhizopogon roseolus</i>	392	196	Esporas	Experimento 2	10 ⁶
<i>Rhizopogon roseolus</i>	640	294	Esporas	Experimento 3	2·10 ⁷
<i>Rhizopogon luteolus</i>	568	252	Esporas	Experimento 3	10 ⁷
<i>Scleroderma verrucosum</i>	633	-	Esporas	Experimento 3	10 ⁷
<i>Melanogaster ambiguus</i>	635	-	Esporas	Experimento 3	10 ⁶
<i>Melanogaster ambiguus</i>	450	-	Esporas	Experimento 1	10 ⁵

Tabla 1: Cepas fúngicas empleadas en los distintos experimentos descritos.

Fertilización	Diámetro (mm)	Altura (cm)	Peso Seco Aéreo (g) *	Peso Seco Raíz (g) ^{ns}
No Fertilizado	3.58 a	25.79 a	1.90	0.71
Fertirrigado	3.67 a	33.50 b	2.22	0.68
Osmocote	3.55 a	32.46 b	2.36	0.80

Tabla 3: Porcentaje de planta micorrizada de *P. pinea* bajo diferentes tratamientos de fertilización.

FERTILIZACIÓN	HONGO		INOCULADO	
	<i>Laccaria laccata</i> (T/V)	<i>Pisolithus tinctorius</i> (T/V)	<i>Pisolithus tinctorius</i> (Esporas)	<i>Melanogaster ambiguus</i>
No Fertilizado	100	27	36	92
Fertirrigado	80	18	15	33
Osmocote	39	11	24	48

Tabla 2: Efecto de diferentes tratamientos de fertilización sobre el crecimiento de plantas no inoculadas de *P. pinea*. Valores seguidos de letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según el test de Tukey. (*) Denota diferencias significativas entre tratamientos detectadas por el test de Kruskal-Wallis, y (ns) no significativas.

Hongo	Diámetro (mm) *	Altura (cm)	Peso Seco Aéreo (g) ^{ns}	Peso Seco Raíz (g)
Control	3.58	25.79 a	1.90	0.71 a
<i>L. laccata</i>	3.60	25.77 a	2.07	1.00 b
<i>P. tinctorius</i> (T/V)	3.50	26.36 a	1.81	0.81 a
<i>P. tinctorius</i> (esporas)	3.53	28.31 a	1.95	0.83 ab
<i>M. ambiguus</i>	3.18	27.58 a	1.73	0.74 a

Tabla 4: Crecimiento de plantas de *P. pinea* no fertilizadas, inoculadas con distintos hongos ectomicorrícicos. Valores seguidos de letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según el test de Tukey. (*) Denota diferencias significativas entre tratamientos, detectadas por el test de Kruskal-Wallis, y (ns) no significativas.

Hongo	Porcentaje de Planta infectada	Porcentaje de Micorrización
Control	0	0.0
<i>Laccaria laccata</i>	90	34.4
<i>Rhizopogon roseolus</i>	100	81.3
<i>Pisolithus tinctorius</i>	50	44.1

Tabla 5: Porcentajes de infección y micorrización de *P. pinea* bajo diferentes tratamientos de inoculación. (Vivero Forestal Catalana, 1995.)

Hongo	Sustrato	% Planta Infectada	% Micorrización
<i>Melanogaster ambiguus</i>	Turba - Vermiculita	50	30.9 b
	Turba - Corteza	0	0.0 a
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Turba - Vermiculita	100	58.0 b
	Turba - Corteza	0	0.0 a
<i>Rhizopogon roseolus</i>	Turba - Vermiculita	100	83.1 a
	Turba - Corteza	100	69.6 a
<i>R. luteolus</i>	Turba - Vermiculita	100	88.1 b
	Turba - Corteza	100	57.5 a
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Turba - Vermiculita	100	65.7 b
	Turba - Corteza	0	0.0 a

Tabla 6: Porcentaje de planta infectada y de micorrización, para los diferentes tratamientos de inoculación de *P. pinea*, en función del sustrato utilizado. (Vivero Forestal Catalana, 1996.)