

SÍNTESIS MICORRÍCICA DE *SUILLUS GRANULATUS* (EUMYCOTA) Y PLANTINES DE *PINUS ELLIOTTII* (PINACEAE)

EDUARDO NOUHRA y ALEJANDRA BECERRA¹

Summary: Mycorrhizal synthesis of *Suillus granulatus* (Eumycota) and *Pinus elliottii* (Pinaceae) seedlings. *Suillus granulatus* (L.:Fr.) Kuntze has the capability to form ectomycorrhizae with *Pinus elliottii* Engelm. Mycorrhizal synthesis was successfully achieved by applying fungal spores inoculum, which resulted in a 71% of mycorrhizal colonization. Significant differences were obtained between shoot dry weight and root dry weight of inoculated plants with respect to non inoculated ones; meanwhile root collar diameter and stem height did not differ significantly. The ectomycorrhizae is characterized by the presence of dichotomous branches, a conspicuous white mantle, and abundant emanating cylindrical hyphae with incrustated walls. Based on the results we estimate that *Suillus granulatus* is a suitable fungi for nursery inoculation programs of *Pinus elliottii*.

Key words: *Suillus granulatus*, *Pinus elliottii*, ectomycorrhizal synthesis.

Resumen: *Suillus granulatus* (L.:Fr.) Kuntze tiene la capacidad de micorrizar plantines de *Pinus elliottii*, Engelm. La utilización de inóculo de esporas fúngicas para la síntesis micorrízica resultó exitosa, ya que se obtuvo un 71% de colonización micorrízica. Se obtuvieron diferencias significativas entre el peso seco de la parte aérea y radical de las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas; mientras que el diámetro del cuello de la raíz y la altura no difirieron significativamente. La ectomicorriza se caracteriza por la presencia de ramificaciones dicotómicas, un manto blanco, y abundantes hifas emanantes cilíndricas con incrustaciones de pigmentos en sus paredes. En base a los resultados obtenidos, estimamos que *Suillus granulatus* es una especie fúngica adecuada para inocular plantines de *Pinus elliottii* en programas de forestación.

Palabras clave: *Suillus granulatus*, *Pinus elliottii*, síntesis ectomicorrízica.

INTRODUCCIÓN

Las plantaciones de *Pinus elliottii* Engelm. son abundantes en las serranías de la provincia de Córdoba, República Argentina, alcanzando en forestaciones mixtas con *P. taeda* L. un área total de 31901 ha (Izurieta et al., 1993).

Existen numerosos trabajos sobre las ectomicorrizas en el género *Pinus*, sin embargo, en Argentina el conocimiento sobre las mismas se restringe a observaciones a campo o en invernaderos de producción.

Las experiencias de síntesis micorrízica se utilizan en numerosos programas de forestación, utilizando micelio vegetativo como inóculo fúngico de especies forestales (Palm & Stewart, 1984; Marx, 1991; entre otros). Sin embargo los elevados costos de producción, las dificultades en el aislamiento y el mantenimiento de cultivos puros obstaculizan su uso (Trappe, 1977; Marx & Kenney, 1982). Por otro lado, las basidiósporas de hongos ectomicorrízicos cons-

tituyen un inóculo relativamente barato y fácil de aplicar, ya que pueden ser obtenidas en grandes cantidades a partir de basidiocarpos colectados en el campo (Lu et al., 1998). La selección de las especies ectomicorrízicas adecuadas constituye uno de los pasos más importantes en los programas de inoculación de especies forestales (Trappe, 1977).

La simbiosis micorrízica mejora la calidad fisiológica de las plantas destinadas a la reforestación facilitando el establecimiento de los plantines en el campo (Duñabeitia et al., 1996). Así, al llevar a cabo el proceso de selección, es de vital importancia conocer las características de las especies fúngicas que se utilizarán para inocular en relación con los requerimientos de las especies forestales.

Este tipo de inoculaciones en coníferas han sido realizadas en diferentes partes del mundo (Marx, 1976; Alvarez & Trappe, 1983; Parladé et al., 1996). Entre los hongos seleccionados cabe citar: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch (Alvarez & Trappe, 1983), *Suillus granulatus* (Lamb & Richards, 1974a, b), *Thelephora terrestris* Ehrh. ex Fr. (Marx & Ross, 1970) y varias especies de

¹Inst. Mult. de Biología Vegetal (IMBIV)-CONICET, UNC. Av. Vélez Sársfield 299, C.C.495. 5000 Córdoba. Rep.Arg., e-mail: eduardonouhra@hotmail.com, abecerra@imbiv.unc.edu.ar.

Rhizopogon (Lamb & Richards, 1974a; Donald, 1975; Theodorou, 1980; Castellano et al., 1985) entre otras. En la Argentina, Takacs (1961a, b; 1964) fue uno de los pioneros en la producción de inóculo micelial para la inoculación de pinos (*P. pinaster* Ait., *P. pinea* L., *P. halepensis* Mill., *P. radiata* D. Don y *P. thumbergii* Parl.). Sin embargo, en los viveros de producción se realiza el cultivo de plantines de pino, agregando al sustrato de siembra suelo de plantaciones ya establecidas, a fin de propagar las micorrizas existentes en nuevas áreas a forestar (Deschamps, 1978).

En las áreas forestadas de las serranías cordobesas aparecen, en verano y otoño, esporocarpos de diversas especies fúngicas, siendo *S. granulatus* la especie más abundante en los pinares (Domínguez, com. pers.). Existen trabajos sobre especies de *Suillus* asociadas con distintas especies de pinos (*P. radiata*, *P. contorta* Dougl., *P. resinosa* Ait., etc.) que enfatizan la taxonomía de las especies fúngicas, más que su capacidad para formar la asociación simbiótica (Hatch, 1937; Grand, 1968; Chu-Chou, 1979; Malajczuk et al., 1982), mientras que la asociación *P. elliotii* - *S. granulatus* no ha sido evaluada ni descrita hasta ahora. Así, este trabajo tuvo como objetivos, por un lado, evaluar la respuesta de los plantines de *P. elliotii* al inóculo de esporas de *S. granulatus* y determinar la efectividad de la micorrización, y por el otro, caracterizar la micorriza sintetizada.

MATERIAL Y MÉTODO

Material estudiado

ARGENTINA. Prov. Córdoba: Dpto. Punilla, El Durazno, 2-I-1993, L. Domínguez y E. Nouhra 1203 (CORD).

Crecimiento de las plántulas. Semillas ya curadas de *P. elliotii* fueron adquiridas en el IFONA (ex-Instituto Forestal de la Nación) provenientes de la provincia de Misiones. Se germinaron en conos de plástico de 25 cm de profundidad por 7 cm de diámetro, en una mezcla de mantillo, vermiculita y turba (60, 30 y 10 %, respectivamente) previamente esterilizada en autoclave (30 min., 2 atm de presión). Se hicieron 2 lotes (no inoculado e inoculado) de 30 plantas cada uno. La experiencia se realizó en invernadero bajo condiciones de luz natural (10 h) y temperatura ambiente, con la fluctuación correspondiente a cada estación (10-36 °C). Las semillas se regaron con agua corriente

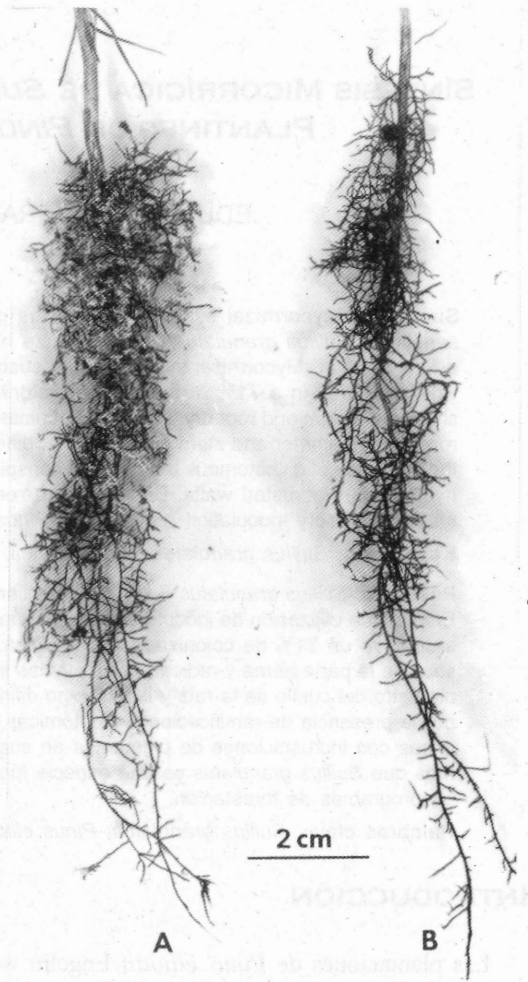


Fig. 1. A-B: Raíces de *Pinus elliotii*. A: raíz de *P. elliotii* micorrizada por *Suillus granulatus*, B: raíz no micorrizada. Nótese mayor desarrollo del sistema radical en A.

dos veces por semana durante el otoño y el invierno, y tres veces por semana en el verano. Para evitar el mal de cuello de raíz ("Damping off"), los plantines fueron regados con una solución de metil tiofanato y agua, y se colocó una delgada capa de arena sobre el sustrato. No se suministró ningún tipo de fertilizante.

Recolección de esporocarpos y Síntesis Micorrícica. Los esporocarpos de *S. granulatus* fueron colectados entre los meses de febrero y abril de 1993, en plantaciones forestales de *P. elliotii* de las Sierras de Córdoba. El inóculo de esporas se obtuvo a partir de los esporocarpos frescos de *S. granulatus*, que se lavaron con agua destilada eliminando todo resto de sustrato. Se tomó la porción fértil de los mismos y licuó con agua destilada durante 2-3 min. hasta

homogeneizar la solución (Castellano & Molina, 1989) conservándose en heladera a 5 °C hasta el momento de la inoculación. Con la finalidad de conservar los microorganismos beneficiosos presentes en los cuerpos de fructificación maduros, el inóculo no se purificó (Li, 1987; Li & Castellano, 1987).

A los cuatro meses de la siembra se realizó la inoculación, regando cada plántula con 10 ml de agua destilada y una concentración de $4,2 \times 10^6$ esporas (Theodorou, 1971). Esta operación fue repetida tres veces, con intervalos de 21 días entre cada una de ellas (Castellano & Molina, 1989). A los 12 meses de la siembra se cosecharon al azar 10 plantines de cada lote (inoculado y no inoculado).

Caracterización ectomicorrícica. Las raíces extraídas, previo lavado con abundante agua corriente para eliminar el suelo adherido, fueron examinadas con lupa estereoscópica Zeiss (12X). Los diferentes planos de la ectomicorriza formada fueron observados al microscopio óptico (Kyowa, 200 - 1000X) realizándose su descripción morfológica y anatómica (color, tipo de ramificación, caracteres del manto, entre otros) según la metodología de Agerer (1991, 1999).

Parámetros registrados de las plantas micorrizadas. De las plántulas cosechadas correspondientes a ambos tratamientos se midió: altura de

tallo, diámetro del cuello de la raíz y peso seco de las partes aérea y radical (Molina, 1979), cuantificándose además el porcentaje de micorrización siguiendo la metodología propuesta por Marks et al. (1968), contando todos los ápices radicales colonizados sobre un total de 100 ápices radicales observados. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y las diferencias entre medias se compararon con el test de Scheffé ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Suillus granulatus desarrolló ectomicorrizas con plantines de *Pinus elliotii*, corroborándose así la efectividad de las esporas como inóculo para formar micorrizas. Se observó que los plantines micorrizados presentaron un sistema radical más desarrollado, con mayor número de ramificaciones laterales, en comparación con los no micorrizados (Fig. 1).

Las ectomicorrizas se reconocieron por sus características morfológicas externas, tales como: color blanco opaco con áreas castaño claro, ramificaciones laterales cortas generalmente dicotómicas, algunas apretadas y de apariencia coraloide (Fig. 2). Manto compuesto por tres capas, la externa plecten-



Fig. 2. Detalle del sistema micorrícico dicotómico formado por *Pinus elliotii* y *Suillus granulatus*. m: manto fúngico; r: rizomorfos blancos.

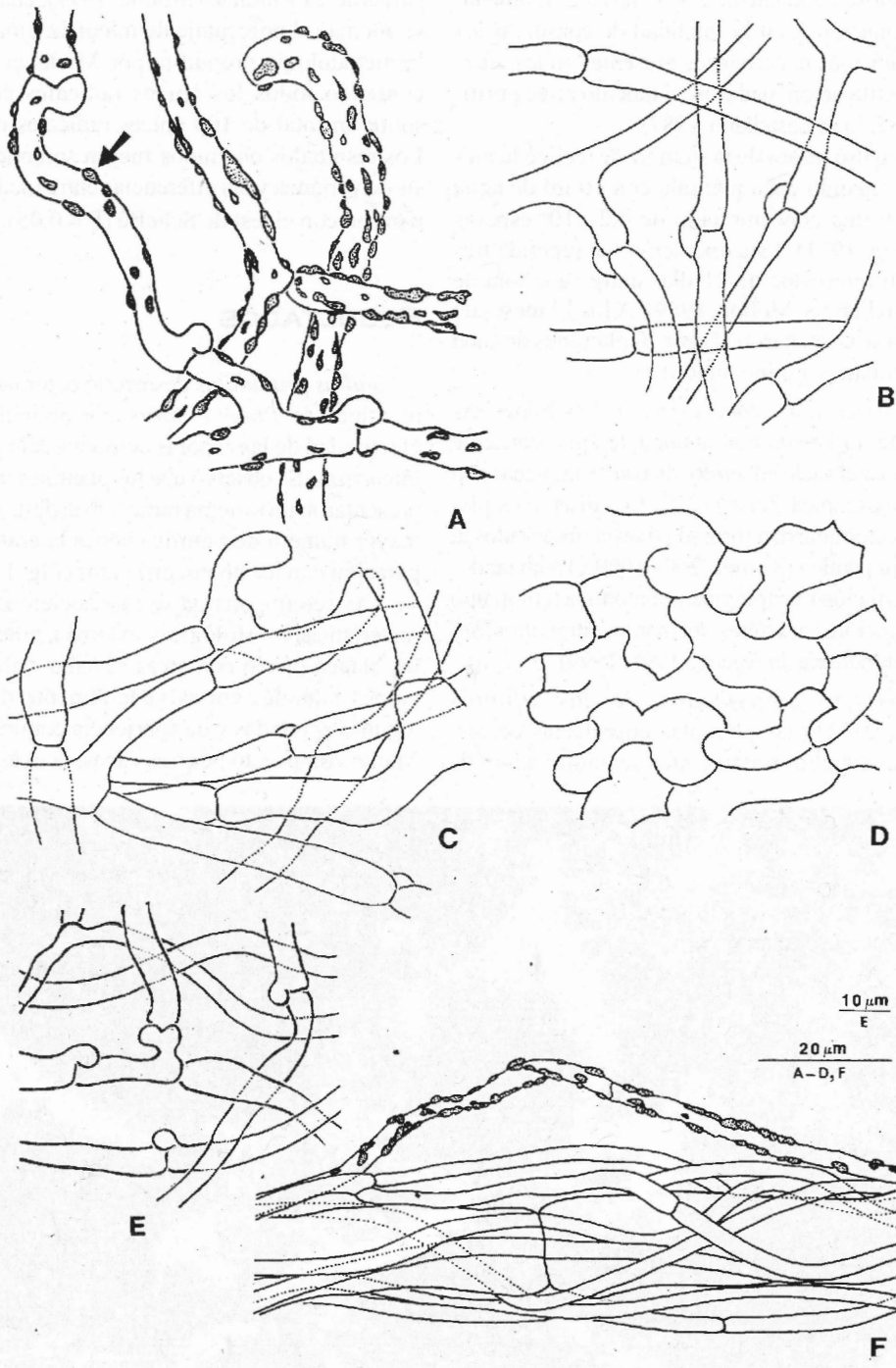


Fig. 3. A-F: Ectomicorriza de *Suillus granulatus*. **A:** Hifas emanantes del manto radical con pigmentos incrustados sobre la pared (→). **B:** Hifas fibuladas de la capa externa del manto. **C:** Capa media con hifas dispuestas de forma intrincada. **D:** Capa interna pseudoparenquimática. **E:** Hifas emanantes septadas y fibuladas de los rizomorfos. **F:** Corte longitudinal por un rizomorfo delgado con su zona central.

quimática, laxa, con hifas cilíndricas, fibuladas y ramificadas, de 1 - 2 μm de diámetro (promedio = 1,6 μm), abundantes hifas emanantes con incrustaciones de pigmentos sobre su superficie (Fig. 3 A, B). Capa media plectenquimática, intrincada y apretada, con hifas cilíndricas de 1,5 - 2,5 μm de diámetro (promedio = 1,8 μm) (Fig. 3 C). Capa interna pseudoparenquimática, con células irregulares de 1,5 - 4 μm de diámetro (promedio = 2,5 μm) (Fig. 3 D). Rizomorfos blancos, abundantes, de 12-160 μm de diámetro (promedio = 78 μm) emergiendo del manto (Fig. 2), con una médula (zona central) de hifas cilíndricas gruesas de 6,5 - 16 μm de diámetro (promedio = 10,2 μm), y una corteza de hifas cilíndricas más delgadas de 2,5 - 4,8 μm de diámetro (promedio = 3,6 μm), entretejidas, de paredes lisas, septadas y ramificadas (Fig. 3 F). Los rizomorfos poseen numerosas hifas emanantes con y sin fibulas, de 1,6 - 3,2 μm de diámetro (promedio = 2,4 μm), algunas con incrustaciones de pigmentos en la superficie (Fig. 3 E, F).

Las plántulas no inoculadas (control) mostraron, macroscópicamente, diferencias en el largo de las acículas (los plantines inoculados desarrollaron acículas más largas y resistentes en comparación con los no inoculados). Al momento de la cosecha, hubo diferencias significativas en la porción aérea y radical de las plantas micorrizadas respecto a las no micorrizadas. El peso seco de la parte aérea y de la parte radical fueron 69 y 39 % respectivamente más alto en las plantas inoculadas versus las no inoculadas (Tabla 1). El porcentaje de colonización micorrízica fue del 71%, resultando significativamente diferente a la del control, donde no hubo micorrización. No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para los parámetros de respuesta diámetro del cuello de la raíz y altura de los plantines entre ambos tratamientos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La inoculación con esporas ha sido usada en distintas especies de pinos (Castellano et al., 1985; Castellano & Trappe, 1985; Torres & Honrubia, 1994; Parladé et al., 1996). Hasta la actualidad, en nuestro país, no se había realizado estudio alguno sobre el uso de esporas como inóculo fúngico. Estos resultados muestran que es un método efectivo para la formación de micorrizas entre *Suillus granulatus* y *Pinus elliotii* bajo condiciones de invernadero, evidenciándose además, un incremento de la biomasa aérea y radical de los plantines micorrizados con respecto al control (Tabla 1). Estos resultados son importantes al momento de seleccionar especies fúngicas para inocular, siendo fundamental su habilidad para colonizar y extenderse en la rizósfera de la planta hospedante.

En el presente trabajo se describen por primera vez las características morfológicas y anatómicas de la ectomicorriza entre *S. granulatus* y *P. elliotii*. La micorriza sintetizada entre *P. contorta* con *S. granulatus* (Rifle, 1973) y entre *P. strobus* L. con *S. granulatus* (Palm & Stewart, 1984), presentan características morfológicas similares a las observadas en este estudio tales como color, pigmentación, tipo de ramificación y manto. Sin embargo, a diferencia de lo citado por estos autores, la micorriza entre *S. granulatus* y *P. elliotii* presenta hifas fibuladas en la capa externa del manto.

Los ensayos aquí presentados demuestran que el uso de esporas como inóculo es un método importante para el estudio aplicado de micorrizas, siendo *S. granulatus* una especie adecuada para su uso como inóculo de plantines de *P. elliotii*, tanto para la agroforestación como para la reforestación de áreas degradadas.

Tabla 1. Crecimiento y Porcentaje de micorrización de plantines de *Pinus elliotii* de doce meses de edad inoculados con esporas de *Suillus granulatus*.

Nota: Las cifras expresan las medias para cada una de las variables medidas. Los tratamientos que no comparten una letra en común difieren significativamente según el test de Scheffé ($P < 0,05$). Entre paréntesis se muestran los desvíos "standard" registrados.

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro del cuello de la raíz (cm)	Peso seco de la parte aérea (g)	Peso seco de la parte radical (g)	Porcentaje de micorrización (%)
Inoculados	23,05 a (1,49)	3,22 a (0,10)	1,67 b (0,14)	0,46 b (0,04)	71,20 b (4,23)
No inoculados	20,77 a (1,08)	3,13 a (0,21)	0,99 a (0,08)	0,33 a (0,03)	0 a

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Biól. Adriana Salvo por su asesoramiento en el análisis estadístico, al Dr. A. Cocucci y al Biól. M. Zak por sus comentarios sobre el manuscrito, y a la Dra. L. Domínguez por su seguimiento y aportes realizados.

BIBLIOGRAFÍA

- AGERER, R. 1991. Characterization of Ectomycorrhiza. In: NORRIS, J. R., D. J. READ & A. K. VARMA (eds.), *Techniques for the study of mycorrhiza, Methods in Microbiology*, pp. 25-73. Academic Press, London.
- AGERER, R. 1999. Anatomical Characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: VARMA, A. K. & B. HOCK (eds.), *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 633-682. 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- ALVAREZ, I. F. & J. M. TRAPPE. 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.
- CASTELLANO, M., J. TRAPPE & R. MOLINA. 1985. Inoculation of container grown Douglas fir with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. *Can. J. For. Res.* 15: 10-13.
- CASTELLANO, M. & J. TRAPPE. 1985. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas-fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. *Can. J. For. Res.* 15: 613-617.
- CASTELLANO, M. & R. MOLINA. 1989. Mycorrhizae. In: LANDIS, T. D., R. W. TINUS, S. E. Mc DONALD & J. P. BARNETT (eds.), *The container tree nursery manual*, pp. 101-167. Department of Agriculture, Forest Service, Washington, DC.
- CHU-CHOU, M. 1979. Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 11: 557-562.
- DESCHAMPS, J. R. 1978. Aspectos técnico-económicos de la producción de micorrizas en Pinos. Actas Tercer Congreso Forestal Argentino, Buenos Aires, pp. 301-303.
- DONALD, D. 1975. Mycorrhizal inoculation for pines. *S. African. Forest. J.* 92: 27-29.
- DUÑABEITIA, M. K., S. HORMILLA, J. SALCEDON & J. I. PEÑA. 1996. Ectomycorrhizae synthesized between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. *Mycologia* 88 (6): 897-908.
- GRAND, L. F. 1968. Conifer associates and mycorrhizal syntheses of some Pacific Northwest *Suillus* species. *Forest Sci.* 14: 304-312.
- HATCH, A. B. 1937. The physical basis of mycotrophy in *Pinus*. *Black Rock Forest Bull.* 6: 1-168.
- IZURIETA, G., L. MUGAS & J. IZARRALDE. 1993. Proyecto "Plantaciones de pinos de la Provincia de Córdoba", pp. 1-15. Dirección de Recursos Naturales Renovables de la Provincia de Córdoba.
- LAMB, R. & B. RICHARDS. 1974a. Survival potential of sexual and asexual spores of ectomycorrhizal fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 62: 181-191.
- LAMB, R. & B. RICHARDS. 1974b. Inoculation of pine with mycorrhizal fungi in natural soil. I. Effects of density and time of application of inoculum and phosphorus amendment on mycorrhizal infection. *Soil. Biol. Biochem.* 6: 167-171.
- LI, C. 1987. Diazotrophic bacteria in sporocarps of ectomycorrhizal fungi, *Barssia oregonensis*, *Hysterangium setchellii*, *Leccinum scabrum*, and *Rhizopogon parksii*. In: SYLVIA, D., L. HUNG & J. GRAHAM (eds.), *Proceeding of 7th North American Conference on Mycorrhizae*.
- LI, C. & M. CASTELLANO. 1987. *Azospirillum* isolated from within sporocarps of mycorrhizal fungi *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* & *Rhizopogon vinicolor*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 88: 563-565.
- LU, X., N. MALAJCZUK & B. DELL. 1998. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 8: 81-86.
- MALAJCZUK, N., R. MOLINA & J. M. TRAPPE. 1982. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New Phytol.* 91: 467-482.
- MARKS, G. C., N. DITCHBURNE & R. C. FOSTER. 1968. Quantitative estimates of mycorrhiza populations in radiata pine forests. *Aust. For.* 32: 26-38.
- MARX, D. & E. ROSS. 1970. Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*. *Can. J. Bot.* 48: 197-198.
- MARX, D. 1976. Synthesis of ectomycorrhizae on loblolly pine seedlings with basidiospores of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.* 22: 13-20.
- MARX, D. & D. S. KENNEY. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: SCHENCK, N. D. (ed.), *Methods and principles of mycorrhizal research*, pp. 131-146. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, U.S.A..
- MARX, D. 1991. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: The Marcus Wallenberg Foundation Symposia Proceedings 7. *Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest tree*, pp. 54-90. Sweden.
- MOLINA, R. 1979. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and Lodgepole pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.* 25 (4): 585-590.
- PALM, M. E. & E. L. STEWART. 1984. *In vitro* synthesis of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* combinations. *Mycologia* 76 (4): 579-600.

- PARLADÉ, J., J. PERA & I. F. ALVAREZ. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziessi* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 237-245.
- RIFFLE, J. L. 1973. Pure culture synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus ponderosa* with species of *Amanita*, *Suillus* and *Lactarius*. *Forest Sci.* 19: 242-250.
- TAKACS, E. 1961a. Algunas especies de hongos formadores de micorrizas en árboles cultivados en la Argentina. *Revista. Forest. Argent.* 5(3): 80-82.
- TAKACS, E. 1961b. Inoculación de especies de pinos con hongos formadores de micorrizas. *Silvicultura* 15: 5-11.
- TAKACS, E. 1964. Inoculación artificial de pinos de regiones subtropicales con hongos formadores de micorrizas. *I.D.I.A. Suplemento Forestal* 12: 41-44.
- THEODOROU, C. 1971. Introduction of mycorrhizal fungi into soil by spore inoculation of seed. *Aust. For.* 35 (1): 23-26.
- THEODOROU, C. 1980. The sequence of mycorrhizal infection of *Pinus radiata* D. Don. following inoculation with *Rhizopogon luteolus* Fr. apud. Fr. & Nordh. *Austral. Forest. Resources.* 10: 381-387.
- TORRES, P. & M. HONRUBIA. 1994. Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers.) Raushcert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. and *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze. *Ann. Sci. For.* 51: 521-528.
- TRAPPE, J. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 203-222.

Recibido el 07 de Mayo de 2001, aceptado el 27 de Septiembre de 2001.