

INOCULACION MICORRIZICA DE *Pinus ponderosa* EN EL VIVERO FORESTAL DE JUNIN DE LOS ANDES, ARGENTINA (*)

Hernán L. Peredo(**)
Orielle Alonso(***)
Eduardo Valenzuela (**)

RESUMEN

En el vivero forestal de Junín de los Andes Argentina (40° S, 71° W) se realizó un ensayo de inoculación micorrizica de *presiembr* en Octubre de 1988. Después de fumigar el suelo con Bromuro de Metilo se formaron platabandas y se establecieron 30 parcelas de 1 m², separadas cada una por 30 cm, en un diseño de bloques al azar. La inoculación se realizó con inóculo sólido de *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Thelephora terrestris* y *Pisolithus tinctorius*, obtenido en medio Melin-Norkrans modificado. En cada bloque se usaron como controles 1 parcela con suelo de vivero y humus (1:1) y una con suelo de vivero solo.

Después de la inoculación en la hilera se sembró semilla de *Pinus ponderosa* con una densidad de 0.5 kg/m². Tres meses más tarde se extrajeron 10 plantas al azar de cada parcela y se les midió el porcentaje de micorrización, el largo de tallo y raíz y sus respectivos pesos húmedos y secos. Los tratamientos *T. terrestris* y *P. tinctorius* fueron significativamente mejores en largo de tallo, proporción peso seco tallo/peso seco raíz e Índice de calidad de las plantas. Ambos controles fueron significativamente mejores que el tratamiento *L. laccata*.

(*) Proyecto inscrito en la Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad Austral de Chile, y financiado por CORFONE SA (Corporación Forestal Neuquina S.A.) Argentina.

Datos presentados como Poster en : International Conference "Fast Growing Trees and Nitrogen Fixing Trees. 8-12 Octubre, 1989. Philippe-University, Marburg, FRG.

(**) Instituto de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. Casilla 567 Valdivia, Chile.

(***) Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Casilla 567 Valdivia, Chile.



SUMMARY

In a forest nursery at Junín de los Andes, Argentina (40° S, 71°W) a presowing mycorrhizal inoculation trial was performed in October 1988. In fumigated soil (methyl bromide) 30 plots 30 cm apart were established and inoculated in randomized block design. The inocula were *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius*, applied in solid form and grown on modified Melin-Norkrans media. Control plots for each block corresponded to nursery soil and humus (1:1) and nursery soil alone.

After the mycorrhizal inoculation of the planting row, *Pinus ponderosa* seed was sowed at a density of 0.5 kg/m². Three months later 10 seedlings were lifted at random from each plot and the percentage of mycorrhizal inoculation, the length of the stem and roots and their respective wet and dry weight were measured. The *T. terrestris* and *P. tinctorius* treatments were significantly better on stem length, stem dry weight/root dried weight and quality index of the seedlings. Both controls were significantly better than the *L. laccata* treatment.

INTRODUCCION

El suelo del vivero forestal de Junín de los Andes Argentina, (40° S 71° W) es de origen volcánico, con una alta velocidad de infiltración y un bajo contenido de nutrientes. La ubicación geográfica del vivero se caracteriza por 800 mm/año de precipitación, un verano seco y cálido (max. 32° C) y un invierno frío (mínima absoluta ambiental - 19° C), con nieve en las colinas cercanas al vivero. Estas características originan plantas que:

- a) Presentan una raíz principal de hasta 80 cm de largo, con grumos de raicillas apareciendo recién a los 20 - 30 cm de profundidad y sin muestras notorias de micorización.
- b) Necesitan permanecer tres años en el vivero (1 en las platabandas y 2 en trasplante). La especie más usada es **Pinus ponderosa** Laws.

Entre los beneficios de la inoculación micorrízica se pueden citar el aumento en la absorción de nutrientes, el incremento en la resistencia a las temperaturas ambiente extremas y la proporción de una vía adicional para el transporte de agua hacia las raíces de sus hospedantes (Marx & Krupa, 1978; Brownle et al., 1983).

Sobre la base de la evidencia mencionada previamente, se propuso un ensayo a la Corporación Forestal Neuquina S.A (CORFONE S.A.), para mejorar la calidad de sus plantas y acortar su permanencia en el vivero inoculando hongos micorrízicos "de primer estadio" (Last et al., 1987; Castellano 1987; Marx, 1980) en presiembra, usando para ello inóculo sólido (Marx, 1980, Mexal, 1980; Cordell et al. 1987 Tommerup et al., 1987).

Este ensayo debe considerarse como la primera etapa de un programa de investigación para evaluar el efecto de la inoculación artificial de micorizas, en el comportamiento de las plantas en el lugar definitivo de plantación.

MATERIAL Y METODO

La producción de inóculo sólido se realizó según el método del Institut for Mycorrhizal Research and Development (IMRD) (Marx et al. 1984). Placas Petri con medio Melin-Norkrans modificado se inocularon con cultivos puros de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch., proporcionados por el IMRD, y *Laccari laccata* (Scop ex Fr) Berk et Br., *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex Saint-Amais) Quel. y *Thelephora terrestris* (Ehrh.) Fr., adquiridos al American Type Culture Collection e incubados a 25° C por 4 semanas. Luego de la incubación se extrajeron discos de 5 mm de cada cultivo puro para inocular botellas de L, las que contenían un mezcla de vermiculita, turbera fina y medio Melin-Norkrans modificado a pH 5,5. Las botellas se incubaron a temperatura ambiente hasta observar visualmente que toda la mezcla fue permeada por el micelio.

Aproximadamente una semana antes de la inoculación en el vivero, la mezcla fue vaciada en una gaza y lavada bajo agua corriente para remover el exceso de nutrientes. Luego se estrujó suavemente la mezcla, para extraer el exceso de agua, y se dejó secar a 25 - 30° C por 3 días removiéndola constantemente para uniformar el secado. El inóculo se trasladó refrigerado hasta el vivero en contenedores aislados y separados uno para cada cepa.

A mediados de la primavera de 1988 se fumigó el suelo del vivero con Bromuro de Metilo bajo un plástico transparente, el cual se mantuvo en su lugar por 48 h. Después de 48 h de aireación se formaron las platabandas y se establecieron las 30 parcelas de 1 m² separadas cada una de ellas por 30 cm, las cuales fueron inoculadas de acuerdo a un diseño aleatorio con cinco repeticiones por tratamiento, considerándose como tal cada una de las cepas de hongo micorrízico. En cada repetición hubo un control con suelo del vivero y uno con suelo de vivero y humus (1:1), ambos sin inoculación micorrízica. Luego de ubicado el inóculo en las hileras de cada parcela se sembró *Pinus ponderosa* importado desde Oregon (USA) a una densidad de 0.5 k/m². Tres meses más tarde se extrajeron al azar 10 plantas por parcela, a las cuales se les estimó visualmente el porcentaje de micorización. Además se les midió a cada una el diámetro de cuello, el peso fresco, el peso seco, el largo de tallo y el largo de raíz. Adicionalmente, se calculó la proporción peso seco tallo - peso seco raíz y el índice de calidad según Ritchie (1984).

La variabilidad de los resultados de la primera evaluación, llevó a decidir continuar el ensayo con densidades uniformes de 250 -300 plantas/m², para lo

cual se recomendó un raleo de las parcelas. Posteriormente, se mantuvieron en estas condiciones hasta setiembre de 1989, cuando se extrajeron las plantas para el repique que corresponde según el programa de actividades del vivero. En esta oportunidad se seleccionaron 30 plantas por parcela y se midieron las siguientes variables :

- Diámetro de cuello
- Largo de tallo
- Largo de raíz
- Porcentaje de micorrización
- Peso seco de tallo
- Peso seco de raíz

No se calculó el índice de calidad debido a inconvenientes para determinar los respectivos pesos húmedos. Las variables se analizaron estadísticamente, en igual forma que para el primer muestreo.

Para el análisis estadístico de los resultados se usó análisis de varianza y la discriminación de los mejores tratamientos se obtuvo por medio del test de Tukey, con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSION

El porcentaje de inoculación micorrízica, estimado como la cantidad de raicillas bifurcadas en relación al total de ellas en cada planta, no fue significativo, y mostró además una gran variabilidad, por lo que fue descartado como variable de comparación. El largo de tallo, el peso seco total, la proporción peso seco tallo - peso seco raíz y el índice de calidad, mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1
EFEECTO DE LA INOCULACION DE DIFERENTES HONGOS MICORRIZICOS EN LA CALIDAD DE PLANTAS EN EL VIVERO DE JUNIN DE LOS ANDES

Tratamiento	Largo Tallo					Peso Seco Total			Peso Seco Tallo/Raiz					Indice Calidad							
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1 T. terrestris																					
2 P. tinctorius																					
3 Suelo + Humus		*	*					*	*		*	*					*	*			
4 H. crustuliniforme								*													
5 Suelo		*	*								*	*	*				*	*	*		
6 L. laccata			*	*	*			*				*	*					*	*		

* Diferencia significativa entre tratamientos ($p = 0.05$).

La inoculación micorrízica mejoró el crecimiento y la calidad de las plantas en el vivero, salvo con *L. laccata*. Entre las especies micorrízicas inoculadas, sólo se observó diferencias significativas ente *H. crustuliniforme* y *L. laccata* al considerar el largo de tallo. *T. terrestris* y *P. tinctorius* mostraron un aumento significativo en el largo de tallo, peso seco total, proporción peso seco tallo - peso seco raíz e índice de calidad, en comparación con los controles. *H. crustuliniforme* sólo fue significativamente diferente al suelo del vivero, al considerar la proporción peso seco tallo - peso seco raíz. *L. laccata* fue significativamente menos eficaz que ambos controles en relación al largo del tallo, proporción peso seco tallo - peso seco raíz e índice de calidad. Estos resultados concuerdan con los de Chu-Chouá & Grace (1985) y Castellano (1987), quienes demostraron que *L. laccata* y *H. crustuliniforme* no aumentan significativamente el crecimiento de plantas en vivero. Adicionalmente, Marx (1980) y Lee & Koo (1983) demostraron que *P. tinctorius* supera los efectos benéficos de *T. terrestris* en plantas de vivero.

Otro factor importante de considerar en la explicación de los resultados es la calidad de la semilla. Esta se importó desde Oregon (USA) donde fue colectada en 1974 - 1975, certificándose para ella un 45 % de germinación, lo que decidió la alta densidad de siembra en el ensayo. Asumiendo que las características de la semilla y del suelo influyeron en el alto porcentaje de caída y en la desigual densidad de las parcelas (90 - 3000 plantas/m²) en el momento del primer muestreo en el verano de 1989, se decidió ralea las parcelas a una densidad uniforme (250 - 300 plantas/m²) por el resto del ensayo.

Tal como en la primera medición, el porcentaje de micorrización no fue una variable confiable para estimar la bondad de los tratamientos. Ello es perfectamente explicable por el crecimiento de las raíces, que las lleva a entrecruzarse y a enmascarar los resultados con mayor intensidad que en el primer muestreo. A lo anterior debe agregarse la destrucción de las raíces, que en la época de repique es más intensa que en la oportunidad previa. Paralelamente, debe considerarse que con un porcentaje de micorrización tan dispar, como el determinado en el primer muestreo, las plantas extraídas pueden haber representado una gran proporción de la escasa micorrización existente. El porcentaje de micorrización, aún cuando no ha demostrado hasta el momento ser una variable muy confiable, pudiera volverse a considerar sólo en las primeras mediciones, cuando las raíces no han empezado a entrecruzarse.

De las otras variables consideradas en el primer muestreo, sólo el largo de tallo y el peso seco total mostraron diferencias significativas entre algunos tratamientos y, dentro de ellos, hubo un cambio en el comportamiento como puede apreciarse al comparar los Cuadros N°s 1 y 2. Que el tratamiento suelo + humus resulte significativo en este segundo control, respecto de tres tratamientos, pudiera ser interpretado como una mejoría de la capacidad de absorción hídrica del suelo y por ende como un indicador de cómo mejorar la calidad del suelo del vivero sin grandes inversiones.

Las diferencias poco convincentes entre tratamientos y controles, así como el bajo y variable porcentaje de micorrización, pueden explicarse por el pH (6.9-7.5) del suelo del vivero y por su velocidad de infiltración, la que se estabiliza recién a 400 mm/h. El primer factor no parece ser tan restrictivo para el crecimiento de la especie inoculada, especialmente *P. tinctorius* (Marx, 1980). La velocidad de infiltración sin embargo, puede afectar claramente la sobrevivencia del inóculo en el suelo (Marx, 1980; Tommerup et al., 1987) y éste puede ser perfectamente el caso en Junín de los Andes, pues sólo el 30 % de la precipitación ocurre entre Octubre y Abril (Primavera - Otoño). Bajo estas condiciones el suelo se seca rápidamente, a pesar del riego diario, y ello puede explicar además los resultados poco eficaces de la fumigación, ya que a la emergencia de las plántulas se presentó una caída apreciable.



Cuadro N° 2

INOCULACION MICORRIZICA Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE LAS PLANTAS EN EL VIVERO FORESTAL DE JUNIN DE LOS ANDES AL MOMENTO DEL REPIQUE

Tratamiento	Largo Tallo	Peso Seco Total
	1 2 3 4 5 6	1 2 3 4 5 6
1 T. terrestris	*	*
2 P. tinctorius	*	* *
3 Suelo + Humus		*
4 H. crustuliniforme		
5 Suelo		
6 L. laccata		

* Diferencia significativa entre tratamientos ($p=0.05$)

La morfología radicular se apreció bastante deficitaria, a pesar de la existencia de algún grado de micorrización. Anteriormente se aludió a la gran velocidad de infiltración del suelo como un factor limitante para la buena micorrización, acción que pudiera también hacerse extensiva a la morfología de la raíz. En todos los muestreos realizados se notó una elongación de la raíz poco usual, debido seguramente a la búsqueda de humedad por parte de ésta (Read, 1987), y además la formación de un ramillete de raíces a una profundidad en el suelo que en algunos casos alcanzó los 20 cm. Esta velocidad de crecimiento de las raíces está perfectamente documentada y ocurre especialmente en condiciones de estrés hídrico, que es el caso del vivero por la velocidad de infiltración del suelo. La velocidad de elongación de la raíz aumenta en presencia de pH alto (Bartsch, 1987), que es también un condición del vivero. Estos dos fenómenos dificultan la infección micorrizica por cuanto ésta necesita de algún tiempo para producirse. Como el inóculo tiene una ubicación estática en el suelo, al elongarse con mucha rapidez la raíz en busca de agua atraviesa la capa de inóculo sin dar a ésta el tiempo necesario para actuar, luego cuando el ramillete de raíces se ubica en una zona más profunda que la capa de inóculo se hace imposible la micorrización.

En la actualidad se reconoce la importancia de medir la calidad de las plantas no sólo en el vivero, sino que es necesario además hacerlo en el terreno definitivo de plantación, pues hay evidencia de plantas que aún inoculadas en vivero con micorrizas crecen menos que los testigos, sin

embargo en terreno son capaces de recuperarse hasta superar a las que fueron más altas en el vivero (Stenström y Ek, 1990).

En terreno es importante medir el porcentaje de sobrevivencia y también el crecimiento de las plantas (Duryea, 1985). Por ello es recomendable medir el porcentaje de prendimiento según las normas que tenga establecidas para el efecto la empresa. Al cabo de un año después del establecimiento definitivo en terreno, se recomienda realizar la última medición de variables de crecimiento (altura total y diámetro de cuello) para hacer la evaluación definitiva del efecto de la micorrización artificial en el vivero. Existen indudablemente otras formas más precisas de medir la calidad de las plantas, tanto en el vivero como en el terreno, pero ellas requieren de una implementación de laboratorio que no justifica la inversión. Para los efectos prácticos de una empresa forestal, las variables morfológicas han demostrado una validez aceptable (Thompson, 1985).

Se comprobó la factibilidad de aplicar la técnica del inóculo sólido en viveros forestales. Se sugiere estudiar el comportamiento de otras especies micorrízicas para seleccionar la de mejor desempeño en las condiciones especiales de éste vivero. Se postula que un aumento de la eficiencia de la micorrización puede estar ligado con mejor calidad de semilla y regularización del drenaje del suelo del vivero.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al Sr. Gastón Vergara (Centro de Computación, Universidad Austral de Chile) por su acertada y especializada cooperación en el análisis estadísticos de los resultados.

REFERENCIAS

Brownlee, C.; Duddrige, J.A.; Malibari, A. & Read, D.J., 1983. The Structure and Function of Mycelial System of Ectomycorrhizal Roots with Special Reference to their

Role in Forming Inter-plant Connections and Providing Pathways for Assimilate and Water Transport. *Plant Soil* 71 : 433 - 443

Bartsh, N., 1987. Responses of Root Systems of Young *Pinus sylvestris* and *Picea abies* Plants to Water Deficits and Soil Acidity. *Can. J. For. Res.* 17 (8) : 805 - 812.

Castellano M. A., 1987. Ectomycorrhizal Inoculum Production and Utilization in the Pacific Northwestern U.S.- Glimps at the Past, a Look to the Future. In Sylvia, D. M.; Hung, L. L. & Graham, J. H. eds. *Mycorrhizae in the Next Decade Practical Application and Research Priorities* NACOM Gainesville, FL (USA). May 3 - 8, 1987. Proceedings : 293 - 295

Chu-Chou, M. & Grace, L.J., 1985. Comparative Efficiency of the Mycorrhizal Fungi *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon* Species on Growth of Radiata Pine Seedlings. *N. Z. J. Bot.* 23 : 417 - 424.

Cordell, C.E.; Marx de; H.; Maul, S.B. & Owen, J.H., 1987. Production and Utilization of Ectomycorrhizal Fungal Inoculum in the Eastern United States. In Sylvia, D. M.; Hung, L. L. & Graham J. H. eds. *Mycorrhizae in the Next Decade Practical Application and Research Priorities*. NACOM, Gainesville, FL (USA), May 3 - 8, 1987. Proceedings. 287 - 289

Duryea, M.L., 1985. Evaluating Seedling Quality : Importance to Reforestation. In Duryea, M.L (ed. 1985 Evaluating Seedling quality : Principles, Procedures and Predictive Abilities of Major Test. Workshop held October 16 - 18, 1984. Forest Research Laboratory, Oregon State University. Proceedings : 1 - 4.

Last, F.T.; Dighton, J. & Mason, P.A., 1987. Successions of Sheathing Mycorrhizal Fungi. *Tree* 2 (6) : 157 - 161.

Lee, K.J. & Koo, C.D., 1983. Inoculation of Pines in a Nursery with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* in Korea. *Plant Soil* 71 : 325 - 329.

Marx de, H., 1980. Ectomycorrhizal Fungus Inoculations : A Tool for Improving Forestation Practices. In Mikola P. ed. *Tropical Mycorrhizal Research*. Oxford, Clarendon : 13 - 71.

Marx de, H. & Krupa, S.V., 1978. Mycorrhizae a Ectomycorrhizae. In Dommergues, Y. R. & Krup S. V eds *Interactions Between Non-pathogenic Soil Microorganisms and Plants*. Amsterdam, Elsevier : 373 - 400.

Mexal, J.G., 1980. Aspects of Mycorrhizal Inoculation in Relation to Reforestation. *N. Z. J. For. Sci.* 10 (1) : 208 - 217.

Read, D.J., 1987. Development and Function of Micorrhizal Hyphae in Soil. In Sylvia, D. M.; Hung, L. L. & Graham, J. H. eds. *Mycorrhizae in the Next Decade Practical Applications and Research Priorities*.

NACOM. Gainesville, FL (USA), May 3 - 8, 1987. Proceedings : 178 -180.

Ritchie, G.A., 1984. Assessing Seedling Quality. In Duryea, M. L. & Landis T de eds. *Forest Nursery Manual : Production of Bare Root Seedlings*. The Hague, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk : 243 - 259.

Stenström, E. & Ek, M., 1990. Field Growth of *Pinus sylvestris* Following Nursery Inoculation with Mycorrhizal Fungi. *Can. J. For. Res.* 20 (7) : 914 - 918.

Thompson, B.E., 1985. Seedling Morphological Evaluation - What You Can Tell by Looking. In Duryea, M.L. ed., 1985. *Evaluating Seedling Quality : Principles, Procedures and Predictive Abilities of Major Test*. Workshop held October 16 - 18, 1984. Forest Research Laboratory, Oregon State University. Proceedings : 59 - 71.

Tommerup, I.C. & Malajczuk, N., 1987. Ectomycorrhizal Inoculum Production and Utilization in Australia. In Sylvia, de M. Hung L. L. & Graham, J. H. eds. *Mycorrhizae in the Next Decade Practical Applications and Research Priorities*. NACOM, Gainesville, FL (USA) May 3 - 8, 1987 Proceedings : 293 - 295.