

FORMACION DE MICORRIZAS EN PINOS CENTROAMERICANOS
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

por

CONRADO M. VOLKART

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

Centro de Enseñanza e Investigación

Turrialba, Costa Rica

Agosto, 1964.

FORMACION DE MICORRIZAS EN PINOS CENTROAMERICANOS
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS

Tesis

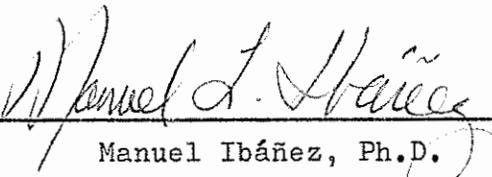
Sometida al Consejo de Estudios Graduados como
requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

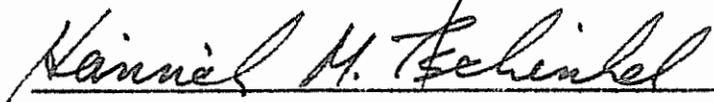
APROBADA:


Manuel Ibáñez, Ph.D.

Consejero


Eduardo Jiménez, Ph.D.

Comité


Heinrich M. Tschinkel, M.S.

Comité

Agosto, 1964

A mis padres

A mi esposa e hijas

AGRADECIMIENTOS

El autor deja constancia de su agradecimiento:

A la Organización de Estados Americanos (OEA), por haberle otorgado una beca para efectuar estudios postgraduados en Turrialba.

A los miembros de su comité consejero, Dres. Gerardo Budowski, Ludwig Müller, Eduardo Jiménez y Manuel Ibáñez, e Ings. Heinrich M. Tschinkel y Gerardo Schreuder, por el útil asesoramiento prestado en la ejecución de este trabajo.

Al Dr. A. J. Hansen, inspirador y orientador inicial del mismo.

Al Dr. Edward Hacskaylo, del U.S. Forest Service, por haberle proporcionado la mayor parte de los cultivos puros de los hongos ensayados, como asimismo valiosa información sobre técnicas experimentales.

Al Dr. Lee Hutchins, por haber leído el proyecto de tesis y haber hecho provechosos comentarios.

A los Dres. Eddie Echandi y Alberto Taylor, por sus valiosas sugerencias en los aspectos de micología y microtecnia, respectivamente.

Al Dr. Frederick Hardy, por haberle facilitado literatura y elementos necesarios para la ejecución de los experimentos.

Al Ing. Julio Molineros, por la valiosa ayuda prestada en la preparación del material fotográfico. En el mismo sentido, al Sr. Manuel Mora.

A la Sra. Mireya de Vega por el trabajo de mecanografía.

A los compañeros de estudio que de una manera u otra lo han secundado, y en el mismo sentido, al personal del Programa de Desarrollo Forestal y de los laboratorios de fisiología y de fitopatología del IICA, en Turrialba.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Buenos Aires, Argentina, el 16 de febrero de 1931. Cursó sus estudios primarios y secundarios en la provincia de Misiones.

Su título de ingeniero agrónomo lo obtuvo en 1956 en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.

En 1957 actuó como técnico de la Dirección de Economía Forestal, Departamento Mapa Forestal y Ordenaciones, de la Administración Nacional de Bosques de su país.

Entre los años 1958 y 1960 se desempeñó en los servicios de extensión agrícola, primero del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), con asiento en Misiones, y luego de la Dirección de Asuntos Agrarios de Misiones.

En el año 1961 entró a trabajar como asesor forestal de la Dirección de Tierras y Bosques de Misiones, cargo que desempeñó hasta el momento de ingresar al Centro de Enseñanza e Investigación del IICA, en Turrialba.

Su permanencia en este Centro fue en calidad de estudiante graduado del Programa de Desarrollo Forestal y se prolongó desde setiembre de 1962 hasta agosto de 1964.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	4
Anatomía y morfología de las micorrizas de los pinos ...	5
Técnicas experimentales en el estudio de las micorrizas	8
MATERIALES Y METODOS	13
Obtención de las plantas	15
Experimento Nº 1	15
Experimento Nº 2	17
Multiplicación de los hongos y preparación de los inóculos	18
Inoculación y cultivo	19
Experimento Nº 1	19
Experimento Nº 2	20
Toma y acondicionamiento de muestras	21
Experimento Nº 1	21
1. Registro del peso de las plantas	21
2. Corte de raicillas	21
3. Procesamiento de las raicillas y preparación de secciones	22
4. Observación al microscopio	23
Experimento Nº 2	23
RESULTADOS	25
Germinación y desarrollo de las plantas	25
Experimento Nº 1	25
Experimento Nº 2	26
Multiplicación de los hongos	26
Formación de micorrizas	27
Experimento Nº 1	27
Experimento Nº 2	27

	Página
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	39
RESUMEN	41
SUMMARY	45
LITERATURA CITADA	48
APENDICE	52

(Incluye fotografías del 1 al 15)

INTRODUCCION

En sentido estricto, se entiende hoy por micorrizas a las estructuras morfológicas constituidas por micelio fúngico y raíces verdaderas de plantas superiores.

Si bien en el campo de la ciencia pura subsisten aún controversias acerca de la verdadera naturaleza biológica de estas asociaciones, en la práctica forestal se acepta como un hecho real la existencia de una estrecha interrelación entre ellas y el crecimiento normal de muchas especies arbóreas, entre ellas los pinos.

Cuando los árboles crecen espontáneamente o han sido plantados dentro de su ambiente natural, la asociación micorrízica se establece en ellos también naturalmente, posibilitando su desarrollo normal. Cuando, en cambio, los árboles crecen fuera de su ambiente natural, la asociación micorrízica suele no establecerse naturalmente, afectándose el desarrollo. Tal es el caso de plantaciones efectuadas en terrenos no forestales o en forestales de ambiente ecológico distinto al de la o las especies plantadas.

La falta de establecimiento de asociaciones micorrízicas en los casos mencionados se atribuye a la ausencia de hongos micorrizantes apropiados en el suelo. Para remediar esta situación, en la práctica forestal se ha recurrido a diversos métodos: a) el uso, en los viveros, de tierra en la cual se ha comprobado la existencia de hongos micorrizantes; b) el empleo, en los viveros o en los sitios definitivos de plantación, de plantas enteras o de raíces micorrízicas; c) el uso, especialmente en los viveros, de hongos micorrizantes, ya sea en forma de esporas o de cuerpos fructíferos, o bien como cultivos puros.

Aunque de aplicación sencilla y bastante difundidos, los dos primeros métodos tienen sus inconvenientes: el uso de tierra puede resultar muy costoso, encierra el peligro de introducir organismos perjudiciales junto con los hongos micorrizantes, y no siempre queda asegurado el éxito debido a que se desconoce la identidad de tales hongos, y muchas veces su comportamiento con la o las especies que se intenta micorrizar. El empleo de plantas o raíces micorrízicas suele también resultar costoso. Ambos métodos pueden además resultar impracticables, al iniciarse programas de forestación en zonas muy apartadas.

El empleo directo de hongos micorrizantes está libre de las desventajas señaladas. Desde luego, debido a que dichos hongos exhiben especificidad de grado variable y a que por otra parte en la formación de micorrizas influyen diversos factores del medio, se requiere el conocimiento previo de la capacidad de los hongos para formar asociaciones con la o las especies arbóreas en cuestión, y en el ambiente particular de que se trate. Asimismo, se necesitan conocer técnicas adecuadas de inoculación en viveros.

Muchos experimentos conducentes a la obtención de tales datos se han llevado a cabo o se están realizando en distintas partes del mundo, sobre todo en Europa, Estados Unidos y la Unión Soviética, pero con referencia casi exclusiva a las especies arbóreas nativas de esos sitios. En América Latina, o con referencia a especies arbóreas de esta área, no existen casi trabajos similares. Esta circunstancia ha alentado al autor a llevar a cabo la presente investigación, con el objetivo principal de estudiar el comportamiento, bajo condiciones controladas, de distintos hongos micorrizantes inoculados al estado de cultivos puros sobre plantas de tres especies de pinos centroamericanos.

El trabajo intenta cubrir la primera parte de un programa de investigación más amplio, a completarse posteriormente con el estudio de la influencia de los factores de sitio y de la efectividad de distintos métodos de inoculación en viveros, en el establecimiento de las formaciones micorrízicas aquí estudiadas.

REVISION DE LITERATURA

Si bien para encontrar la primera referencia sobre observación y descripción de micorrizas deberíamos remontarnos a Teofrasto en el siglo IV A.C. (14), es recién en la segunda mitad del siglo pasado cuando realmente se inicia el conocimiento de estas asociaciones. Es por entonces cuando Frank publica sus clásicos trabajos sobre el tema, introduciendo por primera vez el término micorriza (10, 14, 28).

Las controversias que aún hoy subsisten entre los biólogos acerca de la naturaleza de las asociaciones micorrízicas datan de esos primeros tiempos de Frank. En tales controversias se han definido dos posiciones principales: la de una mayoría que sostiene que las micorrizas son asociaciones simbióticas propiamente dichas, benéficas, y la de otro grupo para el cual serían asociaciones simbióticas antagónicas, de tipo parasitario. Existen, además, unos pocos que creen que las micorrizas constituyen un caso de asociaciones indiferentes (10, 14, 15, 28).

Independientemente muchas veces de estas controversias, en la práctica forestal se han venido acumulando observaciones que tienden a reforzar la opinión de que las micorrizas, al menos las que se encuentran en las especies arbóreas, son realmente benéficas. Entre las primeras referencias significativas al respecto cabe mencionar a Hatch (12), quien comenta además de sus propias observaciones, las primeras registradas en la literatura, que serían las de Melin en 1917 y de Kessell en 1927. En años posteriores se acumularon referencias provenientes de distintas partes del mundo, como las de McComb (18), Routien y Dawson (30), Wilde (42) y muchas otras, de las cuales Levisohn (15) ha hecho

una amplia revisión. En los últimos años se han sumado otras varias contribuciones, incluyendo zonas tropicales o latinoamericanas como las de Briscoe (1), Goss (5), Mukherji y Thapar (25), Takacs (35, 36), Raets (27) y Vega Condori (40).

Las micorrizas han sido estudiadas desde distintos puntos de vista. Sin contar las experiencias de tipo más bien práctico, la mayor parte de los conocimientos se han acumulado en dos campos principales: morfología y fisiología, y en un tercero que se ha venido deslindando entre ellos, dedicado a establecer la identidad de las especies de hongos micorrizantes y su aptitud para formar micorrizas sobre distintos hospedantes.

Varias revisiones publicadas dan cuenta de los avances registrados en estos campos. Sin contar los tratados de Rayner (28) y de Hatch (11), ya algo viejos, los principales y más recientes trabajos de este tipo son los de Kelley (14), de Harley (10) y de Melin (21), de carácter general; los de Melin (22, 23), dedicados a fisiología; y la lista de Trappe (38) de hongos formadores de micorrizas ectótrofas.

Anatomía y morfología de las micorrizas de los pinos

La anatomía y la morfología de las micorrizas de los pinos han sido bastante bien estudiadas, como dan cuenta las distintas revisiones (10, 11, 14, 21, 28). En adición a las referencias incluídas en las mismas, cabe mencionar las contribuciones más recientes de Goss (5) y MacDonel (19).

Existen fundamentalmente dos tipos distintos de micorrizas: ectótrofo y endótrofo (8, 10). La diferenciación entre ellos se basa en la

forma de penetración del hongo en los tejidos radicales. En las micorrizas ectótroficas el micelio del hongo forma una capa o manto de espesor variable que envuelve exteriormente la porción de raíz infectada; de este manto salen hifas que penetran la raíz, insinuándose entre las células de las primeras capas corticales y constituyendo lo que se conoce con el nombre de red de Hartig, visible en las preparaciones microscópicas. En las micorrizas endótroficas no se forma manto, y la penetración de las hifas es intracelular (8, 10). Existe además un estado intermedio entre los dos tipos, denominado ectendótrofo (8).

En los pinos sólo se han hallado micorrizas ectótroficas, las más de las veces, y ectendótroficas, en forma más restringida. Como sucede también en otras especies, las micorrizas se forman de preferencia sobre las raicillas o raíces cortas, presentándose en el caso de los pinos una peculiaridad, que es la ramificación dicótoma o bifurcación de la mayor parte de las raicillas infectadas (10, 29). Estas raicillas se observan principalmente en la parte media de las raíces largas (29).

El aspecto exterior de las micorrizas, en pinos y en otras especies, suele presentar variaciones marcadas. Se han elaborado varios sistemas de clasificación para distinguir estas variaciones, habiendo sido tradicionalmente aplicado hasta ahora a los pinos el formulado por Melin en 1927 (10, 19, 29). Melin agrupa las micorrizas ectótroficas de los pinos en cinco categorías, las que designa mediante letras. Así, las micorrizas del tipo A son las que muestran las raicillas simples o bifurcadas dispuestas regularmente a lo largo de las raíces largas, y exhibiendo el manto y la red de Hartig característicos. El tipo B, que se suele confundir a menudo con el A, incluye las micorrizas en las cuales sólo las raicillas de la zona apical de la raíz larga aparecen

infectadas, mientras que las de las zonas subyacentes permanecen sin infección o se forman en ellas pseudomicorrizas. Ambos tipos A y B habían sido incluidos previamente por Melin en una clase única que llamó "Gabelmikorrhiza" (literalmente "micorriza de horqueta"). El tipo C comprende las micorrizas formadas por la reunión de numerosas raicillas infectadas, que se agrupan sobre las raíces largas en masas semejantes a tubérculos o nódulos, y que fueron denominadas previamente por Melin "Knollenmikorrhiza" (literalmente "micorriza de nódulos"). El tipo D reúne las micorrizas que se distinguen por su coloración oscura, a diferencia de las de los tipos anteriores, que son de coloración clara. Este tipo D incluye dos subtipos: DN, correspondiente a la infección del micorrizonte Cenococcum graniforme (Sow.) Ferd. et Winge (Mycelium radialis nigrostrigosum Hatch), de micelio negro característico; y DA, correspondiente a una infección secundaria del hongo no micorrizante Mycelium radialis atrovirens sobre una micorriza del tipo A (10, 19, 29).

Los términos coraloide, arbuscular o arbóreo aplicados a veces en la morfología de las micorrizas ectótrofas, se refieren al tipo de ramificación secundaria producida en las ramas de las raicillas dicótomas (19).

Recientemente MacDonel (19) ha propuesto un nuevo esquema de clasificación de micorrizas, condensado de las clasificaciones existentes, que puede resultar de utilidad práctica. En él da principal énfasis a las micorrizas verdaderas de tipo ectótrofo y ramificación coraloide que divide en dos subtipos: simple y dicotómico, considerando además para el último dos formas: furcada y nodular.

Técnicas experimentales en el estudio de las micorrizas

En los primeros estudios referentes a la identidad de los hongos micorrizantes, ésta se determinaba mediante el simple aislamiento de los micelios hallados sobre las raíces infectadas, o bien basándose en la identidad de los distintos hongos de sombrero cuyos cuerpos fructíferos se observaban comúnmente asociados a los árboles de los bosques. Estos métodos no eran satisfactorios, debido a que por técnicas deficientes frecuentemente se incluían en las aislaciones otros organismos junto con los hongos micorrizantes, en el primer caso, y debido al relativo empirismo, en el segundo (10).

Las técnicas usadas por Melin en sus trabajos entre 1921 y 1925, actualizadas y descritas por el mismo en 1936 (20), vinieron a cambiar el panorama, constituyéndose en el modelo al cual se ajustaron la mayoría de los trabajos posteriores relacionados con el tema, y también otros vinculados a aspectos fisiológicos de las micorrizas (10, 20). Fundamentalmente, el método introducido por Melin consistió en la inoculación de hongos aislados mediante técnicas más depuradas, a plantas crecidas y mantenidas en condiciones de esterilidad, a fin de comprobar la aptitud micorrizante de tales hongos (10, 20).

Melin obtuvo plantas de pino estériles sembrando sobre agar semi-llas desinfectadas, y pasándolas una vez germinadas a frascos conteniendo arena embebida en solución nutritiva, los cuales se mantenían luego cerrados con tapones de algodón. La arena había sido tratada químicamente, el pH se había ajustado a un valor conveniente, entre 4 y 5, y los frascos habían sido esterilizados en autoclave. La inoculación de los hongos se efectuaba luego de transcurridos dos meses del

traspaso de las plántulas a los frascos, y los datos se tomaban luego de seis meses adicionales de cultivo. Los frascos se mantenían en invernadero y el reemplazo del agua evaporada del medio se efectuaba mediante jeringa esterilizada. Para la preparación de los inóculos, Melin perfeccionó las técnicas de aislación a partir de raíces micorrízicas o esporóforos y utilizó medios de cultivo apropiados, principalmente agar de malta y extracto de malta en solución (20).

Aproximadamente por la misma época en que Melin desarrollaba los métodos descritos, McArdle (17) había ensayado en sus experimentos la producción de plantas estériles y la síntesis micorrízica en tubos de ensayo y en frascos de vidrio cerrados, aunque con resultados adversos.

En 1949, Norkrans (26) introdujo el empleo de una solución nutritiva que modificaba ligeramente la utilizada inicialmente por Melin, aumentando la dosis de glucosa e incorporando tiamina, que se había comprobado estimulaba el desarrollo inicial de los hongos.

Una modificación de importancia fue introducida por Hacskaylo (7) con el uso de vermiculita en lugar de arena como sustrato de cultivo. La vermiculita tendría varias ventajas sobre la arena: no requiere tratamiento previo al uso; tiene mayor capacidad de retención del agua; debido a la menor evaporación, se elimina la necesidad de hacer reposiciones frecuentes y se reduce con ello el peligro de contaminaciones; proporciona excelentes condiciones de aeración a las raíces de las plantas y a los hongos; acelera el desarrollo de las micorrizas, acortando el tiempo necesario para completar los experimentos.

Mejoras adicionales a las técnicas básicas de Melin fueron incorporadas por Bryan y Zak en 1961 (2), con el empleo en el invernadero de

un sistema de refrigeración de la base de los frascos y la aplicación parcial de sombra para reducir la excesiva radiación.

En los experimentos en que se ha aplicado la técnica de cultivos estériles, la multiplicación de los hongos a ser utilizados como inóculos se ha basado en procedimientos micológicos corrientes. Un medio de multiplicación frecuentemente usado ha sido el de Hagem, tanto sólido como líquido (2, 31, 39). Para la inoculación se han usado también las dos formas, ya sea mediante trozos de micelio tomados del agar, o mediante suspensiones miceliales (20, 24, 39).

Santoro y Casida (31) perfeccionaron un método especialmente apropiado para la multiplicación de hongos micorrizantes de crecimiento lento. Variantes interesantes en las técnicas de multiplicación fueron también aplicadas por Melin y Das (24) y por Ulrich (39).

Las síntesis positivas obtenidas mediante la aplicación de técnicas de cultivo estéril prueban la aptitud micorrízica, en tales condiciones, de los hongos ensayados sobre las especies arbóreas en cuestión. Las síntesis negativas, sin embargo, como el mismo Melin (20) lo señalara, no demuestran que los hongos sean incapaces de formar micorrizas sobre dichas especies. Para manifestarse, estos hongos pueden requerir condiciones distintas a las proporcionadas en los cultivos estériles, los cuales indudablemente constituyen un medio anormal para el crecimiento tanto del hongo como de la planta, especialmente en lo que respecta a humedad, aeración, intensidad de luz y condiciones de enraizamiento (10).

Recientemente Trappe (37), basándose en estas consideraciones, ha diseñado un sistema de cultivo controlado que eliminaría buena parte de

las desventajas señaladas, haciendo crecer la parte aérea de las plantas fuera de los frascos.

Si bien en condiciones naturales las micorrizas ectótrofas de los pinos suelen ser fácilmente distinguibles, no sucede lo mismo en los cultivos estériles. Aparte de las condiciones anormales que afectan en estos casos el desarrollo micorrízico, hay evidencia de que la típica ramificación dicótoma de las raicillas que suele acompañar naturalmente a la formación de micorrizas, puede también producirse en estas condiciones sin que se establezca la asociación. La bifurcación puede ser inducida por excreciones de los hongos o por sustancias reguladoras del crecimiento de tipo sintético, incorporadas junto con el medio nutritivo (5, 16, 34).

En los trabajos experimentales con cultivos estériles, no basta por lo tanto, para cerciorarse de una manera fehaciente de la producción de asociaciones micorrízicas, la simple observación externa de las raíces de las plantas. Sólo mediante observación microscópica de secciones convenientemente preparadas se podrá tener seguridad acerca de la infección por los hongos.

Existen en la literatura distintas referencias acerca de los métodos más apropiados de fijación y coloreo de estructuras micorrízicas. Cohen y Doak (3), ensayando distintos métodos, obtuvieron los mejores resultados con una mezcla de sulfato crómico, formaldehído y ácido salicílico como solución fijadora y con la combinación de orseillina BB-violeta cristalina para el coloreo. Santos y Santos (32), comparando métodos similares a los ensayados por Cohen y Doak, encontraron como más apropiada para la fijación la mezcla de ácido acético, formaldehído y alcohol (FAA), y como más satisfactorio el coloreo con la combinación

azul de anilina-safranina. Jackson (13) halló resultados semejantes a los de Santos y Santos.

En los trabajos más recientes de este tipo, Doak (4) empleó exitosamente los métodos que resultaron más satisfactorios en los experimentos que había realizado antes con Cohen (3). Bryan y Zak (2) utilizaron para la fijación una solución cromo acética débil, y para el coloreo las combinaciones safranina-verde rápido, orseillina BB-violeta cristalina y safranina-azul de anilina. Trappe (37) usó FAA como solución fijadora y Pianeze III-B y la combinación orseillina BB-violeta cristalina como colorantes.

MATERIALES Y METODOS

Las especies de pino utilizadas en este trabajo fueron: Pinus caribaea Morelet var. hondurensis Barr. et Golf., P. oocarpa Schiede y P. pseudostrobus Lindl. Las semillas de la primera fueron obtenidas por intermedio del organismo FYDEP, de Guatemala, habiendo sido recolectadas en la zona de Poptún, Petén, de ese país. Las semillas de las otras dos especies fueron adquiridas a la firma Timmers & Leyer, de Heemstede, Holanda.

En cuanto a los hongos, se optó por utilizar cultivos puros, que fueron obtenidos de dos laboratorios especializados, en Estados Unidos y Holanda. Sirvió de base para hacer el pedido de los cultivos, una lista preliminar que se elaboró consultando el trabajo de Trappe (38). El criterio de selección aplicado fue escoger las especies que con mayor frecuencia aparecen citadas como formadoras de micorrizas en distintas especies de pinos. También se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por Young (43), en Australia, con Pinus caribaea.

Los hongos finalmente utilizados fueron:

1. Amanita rubescens (Pers. ex Fr.) S.F. Gray (Basidiomycetes, Agaricales)
2. Boletus luteus L. ex Fr. (Basidiomycetes, Agaricales)
3. Paxillus rhodoxanthus (Schw.) Ricken (Basidiomycetes, Agaricales)
4. Russula emetica (Schaeff. ex Fr.) S.F. Gray (Basidiomycetes, Agaricales)
5. Rhizopogon roseolus (Corda) Hollos (Basidiomycetes, Hysterangiales)

6. Cenococcum graniforme (Sow.) Ferd. & Winge (Deuteromycetes, Mycelia Sterilia)
7. Boletus granulatus L. ex Fr. (Basidiomycetes, Agaricales)
8. Suillus aeruginascens (Secr.) Snell (Basidiomycetes, Agaricales)
9. Rhizopogon luteolus Fr. & Nordh. (Basidiomycetes, Hysterangiales).

Las especies numeradas del 1 al 6 fueron obtenidas mediante gentileza del Dr. E. HacsKaylo, del Forest Physiology Laboratory, Beltsville, Maryland, U.S.A. Las especies restantes se adquirieron del Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda. No se pudo disponer en el momento oportuno de cultivo de Boletus viscidus, especie que dió buenos resultados a Young (43), y que se había incluido en la lista preliminar.

El estudio comprendió dos experimentos: uno bajo condiciones estériles (Nº 1) diseñado de acuerdo a las referencias de la literatura consultada; y otro bajo condiciones no estériles (Nº 2). Este segundo experimento se planeó con fines comparativos, a fin de obtener algún indicio acerca de si en el ambiente de Turrialba podrían establecerse o no asociaciones micorrízicas espontáneas por medio de esporas fúngicas transportadas por el viento.

El trabajo experimental se desarrolló en laboratorios e invernaderos del Centro de Enseñanza e Investigación del IICA, en Turrialba. El diseño estadístico adoptado fue el de muestras al azar, con seis plantas por tratamiento.

Fundamentalmente, el trabajo experimental comprendió cuatro etapas, que se considerarán por separado:

Obtención de las plantas

Multiplicación de los hongos y preparación de los inóculos

Inoculación y cultivo

Toma y acondicionamiento de muestras

Obtención de las plantas

Experimento Nº 1

Las plantas se obtuvieron por siembra directa de las semillas en los frascos de cultivo. Las técnicas utilizadas se adoptaron principalmente de los procedimientos usados por Melin (20), Hacskaylo (6, 7, 9, 41) y Bryan y Zak (2).

Se usaron frascos Erlenmeyer de 500 cc, en los cuales se colocó como sustrato una mezcla por partes iguales de arena cuarzosa y vermiculita, formando una capa de alrededor de un centímetro y medio de altura sobre el fondo de los frascos.

La arena utilizada fue previamente tratada con solución de ácido clorhídrico 0.1 N y lavada con agua destilada. La vermiculita, marca Terra Lite de la Zonolite Co., U.S.A., fue zarandeada para eliminar la parte pulverulenta.

Al sustrato mencionado se agregaron aproximadamente, de modo de dejarlo embebido, unos 120 cc por frasco de la solución nutritiva de Melin (20) modificada por Norkrans (26). La composición por litro de esta solución es la siguiente:

Ca Cl ₂	0,05 g
Na Cl	0,025 "
KH ₂ PO ₄	0,50 "
(NH ₄) ₂ H PO ₄	0,25 "
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,15 "
Citrato férrico	1,2 cc de solución al 1%
Glucosa	2,5 g
H ₂ O	hasta completar 1 litro

Luego de ajustarse el pH a un valor de aproximadamente 5,3, se cerraron los frascos con tapones de algodón y se los esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

El valor de pH mencionado es el aconsejable para el adecuado desarrollo de los hongos micorrizantes. Utilizando arena o vermiculita aisladamente, el ajuste se hace a otros valores, pues durante la esterilización en la autoclave ocurren cambios que tienden a bajar el pH en el caso de la arena y a subirlo en el caso de la vermiculita. Cuando se mezclan ambos sustratos, como pudo comprobarse, las tendencias se equilibran y el pH no varía.

Luego de la esterilización se procedió a la siembra de las semillas, operación que se llevó a cabo en cámara de transferencias, tomando las precauciones de asepsia de rigor. Las semillas se trataron previamente a través de los siguientes pasos: lavado ligero en agua jabonosa, enjuagado en agua de grifo, desinfección en solución de bicloruro de mercurio 1:1.000 durante 10 minutos, y enjuagado con agua destilada estéril.

La siembra se realizó a razón de tres semillas por frasco,

tratando de asegurar el nacimiento de suficiente cantidad de plántulas para el experimento, y previéndose el raleo posterior de los sobrantes. Luego de sembrados, los frascos se volvieron a tapar y se los mantuvo en ambiente de laboratorio hasta completarse la germinación de las semillas y el nacimiento de las plántulas. Posteriormente fueron llevados a invernadero, donde se los mantuvo sin tocar hasta el momento de la inoculación.

Experimento Nº 2

En este experimento se utilizaron macetas de cartón parafinado, de base perforada, las cuales se mantuvieron en invernadero apoyadas en platos de plástico para lograr una mejor conservación de la humedad. En estas macetas se colocó como sustrato vermiculita, efectuándose también la siembra directa de las semillas. Como en el Experimento Nº 1, éstas fueron previamente desinfectadas con bicloruro de mercurio. La vermiculita no fue tratada, sometiéndola sólo a un ligero zarandeo luego de extraerla de los sacos sellados.

La humedad del sustrato fue mantenida mediante riegos constantes con agua de grifo mientras duró la germinación y el crecimiento inicial de las plantas. Más adelante se utilizó la solución Melin-Norkrans (sin contener glucosa ni tiamina), aplicándola una vez a la semana a razón de unos 75 cc por maceta. Estas aplicaciones se complementaron con riegos con agua de grifo.

Poco antes de la inoculación se efectuó un raleo, dejando en cada maceta una sola planta. En unos pocos casos de macetas en las que no se había producido germinación, se efectuaron trasplantes a partir de un lote de reserva.

Multiplicación de los hongos y preparación de los inóculos

La multiplicación de los cultivos puros se efectuó en medio de Hagem, sólido y líquido. La composición por litro de este medio es la siguiente:

Extracto de malta	5,0 g
Glucosa	5,0 "
KH_2PO_4	0,5 "
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 "
$\text{NH}_4 \text{Cl}$	0,5 "
Citrato férrico	0,5 cc de solución al 1%
H_2O	hasta completar 1 litro

(Para medio sólido se agregan 15 g de agar por litro)

Para la multiplicación en medio sólido se usaron tubos de ensayo corrientes, empleándose unos 6-7 cc de medio por tubo. Para la multiplicación en medio líquido se utilizaron frascos Erlenmeyer de 125 cc, añadiéndose a cada frasco alrededor de 20 cc de medio.

Luego de adicionado el medio, los tubos y los frascos, taponados con algodón, se esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos. Los tubos se dejaron enfriar luego en posición inclinada.

La transferencia de los cultivos de los tubos originales a los tubos y frascos de multiplicación se realizó asépticamente en cámara de transferencias. Los tubos y frascos así preparados se mantuvieron posteriormente en la oscuridad en ambiente de laboratorio (aproximadamente 23°C), observándose y anotándose regularmente el desarrollo de micelio. Cuando se consideró que el mismo había sido suficiente, se dio por

terminada la multiplicación y se procedió a preparar los inóculos. Este paso se efectuó a los veinticinco días de realizadas las transferencias.

Los inóculos consistieron en suspensiones acuosas de los subcultivos obtenidos en los tubos y frascos de multiplicación. Estas suspensiones se prepararon mediante el uso de una máquina licuadora corriente, mezclando para cada inóculo 100 cc de agua esterilizada y una cantidad de micelio equivalente a la formada en dos tubos inclinados con buen desarrollo. Para uniformar el grado de división de los micelios se hizo funcionar la licuadora durante seis a siete segundos en cada preparación.

Las suspensiones recién preparadas se pasaron a frascos Erlenmeyer estériles de 125 cc, a través de un trozo de gasa también esterilizada, cerrándose enseguida los frascos con tapones de algodón. Todas estas operaciones se realizaron rápidamente con todas las precauciones de asepsia, y en un lugar del laboratorio libre de corrientes de aire y del peligro de contaminaciones.

Inoculación y cultivo

Experimento Nº 1

Cuando las plantas tuvieron un tamaño apropiado, poco más de mes y medio después de la siembra, se procedió a su inoculación con los hongos. La inoculación se efectuó en cámara de transferencias, tomando las precauciones de asepsia corrientes. A cada frasco se le añadieron 5 cc de inóculo recién preparado, y además, cuidando no saturar el sustrato, un promedio de 15 cc adicionales de solución nutritiva Melin-

Norkrans. En los frascos que contenían más de una planta se quitaron las sobrantes, que en algunos casos se trasplantaron a frascos donde no había habido germinación.

Completadas las operaciones anteriores, se volvieron a tapar los frascos y se los llevó nuevamente al invernadero, donde se los mantuvo acondicionados en bandejas metálicas conteniendo agua en constante circulación (véanse fotografías 1 y 2). La temperatura en el interior de los frascos osciló entre 23°C en las horas más frescas y 30°C en las horas de más calor.

Experimento Nº 2

La inoculación de las plantas crecidas en las macetas de cartón se llevó a cabo al cumplirse aproximadamente dos meses de la siembra. A cada maceta se le adicionaron 5 cc de suspensión micelial, y además un promedio de 50 cc de solución nutritiva Melin-Norkrans completa. La suspensión de Suillus aeruginascens resultó escasa para inocularla a las plantas de las tres especies de pino, y sólo se la aplicó a las de P. caribaea var. hondurensis.

Luego de la inoculación se midió la altura del vástago de las plantas, y a partir de este momento la atención se concretó a aplicaciones semanales de solución nutritiva completa, a razón de unos 75 cc por maceta, que se complementaron con riegos con agua de grifo. Aproximadamente un mes antes de concluirse el experimento, se suspendieron las aplicaciones de solución nutritiva, efectuándose sólo riegos con agua. La temperatura media dentro del invernadero en las horas de más calor fue de aproximadamente 34°C.

Toma y acondicionamiento de muestras

Experimento Nº 1

El experimento se dio por finalizado a los cuatro meses de la inoculación. En la toma de muestras se incluyó la totalidad de las plantas bajo ensayo. Esta etapa se llevó a cabo en varios pasos:

1. Registro del peso de las plantas
2. Corte de raicillas
3. Procesamiento de las raicillas y preparación de secciones
4. Observación al microscopio

1. Registro del peso de las plantas

Luego de quitar las plantas cuidadosamente del sustrato, se limpiaron las raíces bajo un chorro de agua de grifo. Tras un secado rápido con papel absorbente, se procedió a separar mediante un corte el sistema radical del vástago, pesándose ambas partes por separado en una balanza de torsión. Enseguida se cortaron las raicillas a ser examinadas y se acondicionaron las raíces sobrantes en estufa de secado, tomándose el peso seco al cabo de 24 horas. A efectos de los cálculos se despreciaron por su ínfimo valor los pesos de las raicillas cortadas.

2. Corte de raicillas

El corte de las raicillas se efectuó en base a referencias de la literatura respectiva (29). Al efecto se escogieron en las raíces largas, las raicillas ubicadas en la parte media de las mismas, prefiriéndose las bifurcadas, aunque se tomaron también algunas simples cuando su proporción era considerable. En cada muestra se seleccionó

un promedio de seis raicillas ubicadas sobre distintas raíces largas, separándolas enteras sobre un trozito de la raíz larga materna. Para los cortes se utilizó un bisturí.

Inicialmente se hizo uso de un estereomicroscopio para ubicar las raicillas apropiadas, aunque luego se lo descartó por considerar que no resultaba de gran ayuda, ya que la presencia externa de micelio fue prácticamente imposible de determinar a simple vista.

3. Procesamiento de las raicillas y preparación de secciones

El procesamiento adoptado se basó principalmente en los procedimientos descritos por Sass (33), cumpliéndose en la siguiente forma:

- a. Fijación en FAA durante 24 horas.
- b. Deshidratación en n-butanol, con intervalos de una hora en cada paso.
- c. Imbibición e infiltración gradual en parafina a 60°C, con intervalos de cambio de 4 horas.

El material se orientó en la parafina como para obtener de preferencia secciones transversales, y un promedio de tres secciones por corte. Se utilizó un micrótopo rotativo, efectuándose los cortes a un grosor de 12 micrones. Como dato complementario se anotó para cada corte si se trataba de raicillas simples o bifurcadas.

Luego del montaje en portaobjetos, las secciones se trataron en la forma usual para el coloreo con la combinación sufranina-verde rápido. Estos colorantes se aplicaron durante 60 minutos y 10 segundos, respectivamente. En ensayos previos se probaron las combinaciones de colorantes orseillina BB-violeta cristalina y safranina-azul de anilina, que no dieron resultados tan satisfactorios como la primera.

En la combinación de colorantes usada, el verde rápido tiñe las paredes primarias de las células de la corteza y las paredes celulares del cilindro central. La safranina mantiene el teñido en los engrosamientos de las paredes celulares de la corteza, y en el micelio del hongo, aunque con tonalidades distintas, lo cual, unido a la forma peculiar en que el micelio del hongo se insinúa entre las paredes celulares para formar la red de Hartig, torna bastante obvia su presencia.

4. Observación al microscopio

La observación de las secciones se efectuó con un microscopio binocular estándar con fuente de luz incorporada, oculares de 12,5 X y juego de objetivos de 2,5 X, 10 X, 40 X y 100 X (inmersión). La observación microscópica fue decisiva, pues en ella se basó la determinación sobre la presencia o ausencia de micorrizas en los distintos tratamientos. Luego de la primera determinación, se hicieron para cada muestra dos más, a título confirmativo.

Se consideró como evidencia de micorriza ectótrofa en las secciones observadas, la presencia de manto y red de Hartig, o sólo red de Hartig. Aunque no se esperó su presencia, se estuvo también atento a la aparición de alguna otra forma de penetración fúngica que pudiera considerarse de tipo micorrízico, tal como un estado ectendótrofo.

Experimento Nº 2

Se concluyó el experimento poco más de cuatro meses y medio después de la inoculación. La toma de muestras se efectuó en la mitad de las plantas bajo ensayo, incluyendo el 50 por ciento de las correspondientes a cada tratamiento, seleccionadas al azar.

Con excepción del registro del peso, en el acondicionamiento de

las muestras se siguieron los mismos pasos que en el Experimento Nº 1. En lugar del peso, se registró la altura del vástago de las plantas antes de extraerlas de las macetas.

RESULTADOS

Germinación y desarrollo de las plantas

Experimento Nº 1

En P. oocarpa y P. pseudostrobus la germinación fue medianamente regular, obteniéndose más de una planta en algunos frascos, mientras que en otros no se produjo germinación. Con los trasplantes efectuados en el momento de la inoculación, se reunió finalmente un total de cuatro plantas para cada tratamiento en P. oocarpa y de cinco plantas por tratamiento en P. pseudostrobus.

En P. caribaea var. hondurensis el porcentaje de germinación fue muy bajo, posiblemente debido a que las semillas eran ya algo viejas. Sólo se obtuvieron 12 plantas de esta especie, lo que obligó a restringir el experimento con la misma a sólo dos especies de hongos, reservando cuatro plantas para cada una y cuatro para los testigos. Los hongos que se escogieron en este caso fueron los que habían mostrado el desarrollo más rápido y el más lento en las multiplicaciones, con fines comparativos.

Poco antes de cumplirse tres meses de la inoculación, las plantas de las tres especies de pino acusaron un desarrollo del vástago tal, que la mayor parte comenzó a doblarse luego de chocar contra el tapón de algodón.

En los Gráficos 1 y 2 pueden apreciarse los valores promedio de los pesos totales, y de los pesos de vástagos y raíces, tanto frescos como secos, de las plantas de los distintos tratamientos al final del experimento. En el Gráfico 3 se han representado los valores de las

relaciones entre los pesos de los vástagos y los de las raíces.

En todos los tratamientos, y también en los testigos, se observó la presencia de raicillas bifurcadas (véanse fotografías 4 a 6).

Experimento N^o 2

También en este experimento se obtuvo germinación más o menos regular con P. pseudostrobis y P. oocarpa, y muy pobre con P. caribaea var. hondurensis. Sin embargo, como se mantuvieron lotes de reserva de las tres especies, resultó posible contar con número suficiente de plantas para realizar los tratamientos planeados.

También en todos los tratamientos y en los testigos se observó en este experimento la presencia de raicillas bifurcadas (véanse fotografías 7 a 9), en este caso en mayor profusión que en el Experimento N^o 1.

Multiplicación de los hongos

Las observaciones hechas en los tubos de multiplicación evidenciaron diferencias en el grado y velocidad de desarrollo de las distintas especies de hongos. Amanita rubescens, Paxillus rhodoxanthus, Rhizopogon roseolus y Cenococcum graniforme tuvieron un buen desarrollo al cabo de seis días. Para alcanzar un desarrollo semejante Boletus luteus requirió 10 días y Rhizopogon luteolus 12.

Las especies restantes, Russula emetica, Boletus granulatus y Suillus aeruginascens, comenzaron su desarrollo recién a partir de los 15 días, siendo su rendimiento micelial más pobre.

En los frascos de multiplicación con medio líquido, sólo se obtuvieron subcultivos con Amanita rubescens, Paxillus rhodoxanthus,

Rhizopogon roseolus y Cenococcum graniforme.

El color del micelio desarrollado en los distintos subcultivos fue blanco, excepto en el caso de Cenocuccum graniforme, que desarrolló su micelio negro característico.

Formación de micorrizas

Experimento Nº 1

Con los datos de las observaciones efectuadas al microscopio se confeccionó el Cuadro 1, en el que se registra la determinación hecha en cada tratamiento y para cada repetición. Los signos positivos indican presencia y los negativos ausencia de infección micorrízica. Se destaca también si se trata de observaciones hechas en secciones de raicillas bifurcadas o de raicillas simples, no bifurcadas. En el mismo Cuadro 1 se incluyen los valores del porcentaje de observaciones positivas registrado en cada tratamiento, que reflejarían la "frecuencia de presencia" de micorriza en cada caso.

Las micorrizas encontradas fueron en todos los casos de tipo ectótrofo, exhibiendo manto y red de Hartig no muy desarrollados, excepto en los tratamientos con Amanita rubescens y Cenococcum graniforme, en que el desarrollo de la red de Hartig fue bastante considerable, abarcando varias capas de células corticales (véanse fotografías 10 y 11).

Experimento Nº 2

En forma semejante a la del Experimento Nº 1, en el Cuadro 2 se expone el resultado de las determinaciones efectuadas por observación microscópica de las secciones de raicillas originadas en condiciones no estériles. Se incluyen las plantas testigo, donde también se observó

presencia de micorrizas. Como la ocurrencia de contaminaciones resultó por tal motivo obvia, no se determinó la "frecuencia de presencia" como en el Experimento N^o 1.

Las micorrizas encontradas no se diferenciaron a simple vista de las halladas en el Experimento N^o 1 (véanse fotografías 13 a 15).

Cuadro 1. Presencia de micorrizas en los distintos tratamientos del Experimento Nº 1.
 Resultados por repetición y "frecuencia de presencia" determinada en base al porcentaje de observaciones positivas.

ESPECIE DE HONGO	E S P E C I E D E P I N O															
	<u>P. caribaea var. hondurensis</u>					<u>P. occarpa</u>					<u>P. pseudostrabus</u>					
	Repetición					Repetición					Repetición					
	I	II	III	IV	Obs. + %	I	II	III	IV	Obs. + %	I	II	III	IV	V	Obs. + %
Amanita rubescens						(-)	+	+	+	75	(+)	+	(+)	(+)	+	100
Boletus luteus						(-)	-	+	(-)	25	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	100
Paxillus rhodoxanthus						(-)	-	-	-	0	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	60
Russula emetica						+	+	-	-	50	(+)	(+)	(+)	(+)	+	100
Rhizopogon roseolus						-	-	+	-	50	-	(+)	(+)	-	-	40
Cenococcum graniforme						+	+	+	-	75	+	(+)	+	(+)	(-)	80
Boletus granulatus						-	-	(-)	+	25	(+)	(-)	(-)	(+)	-	40
Suillus aeruginascens						(-)	(-)	(-)	-	0	-	-	(-)	(-)	(-)	0
Rhizopogon luteolus						-	+	-	-	25	(+)	+	(+)	(-)	-	60

(): cortes de raicillas bifurcadas, en oposición a las restantes, que son cortes de raicillas simples, no bifurcadas.

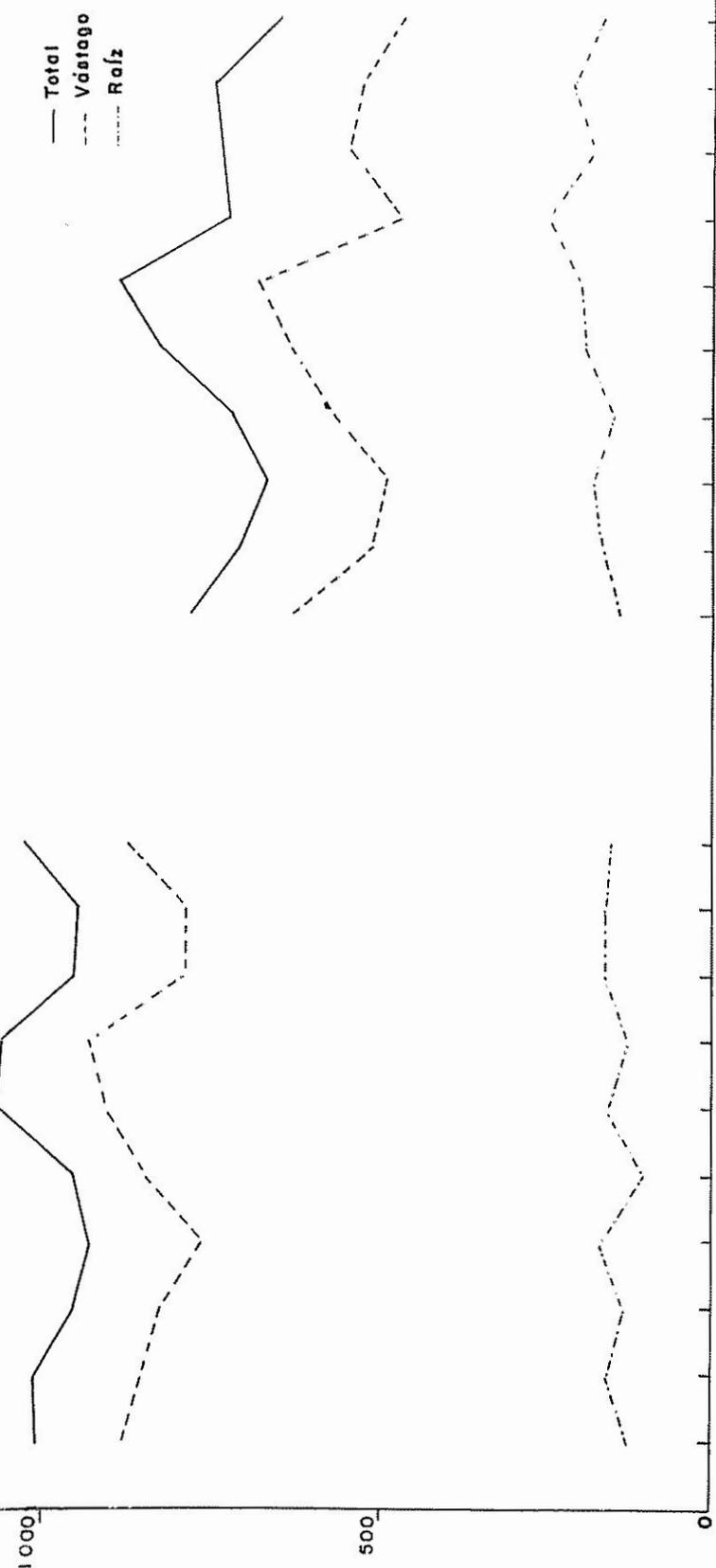
Cuadro 2. Presencia de micorrizas en los distintos tratamientos del Experimento N° 2.

Resultados para tres repeticiones escogidas al azar.

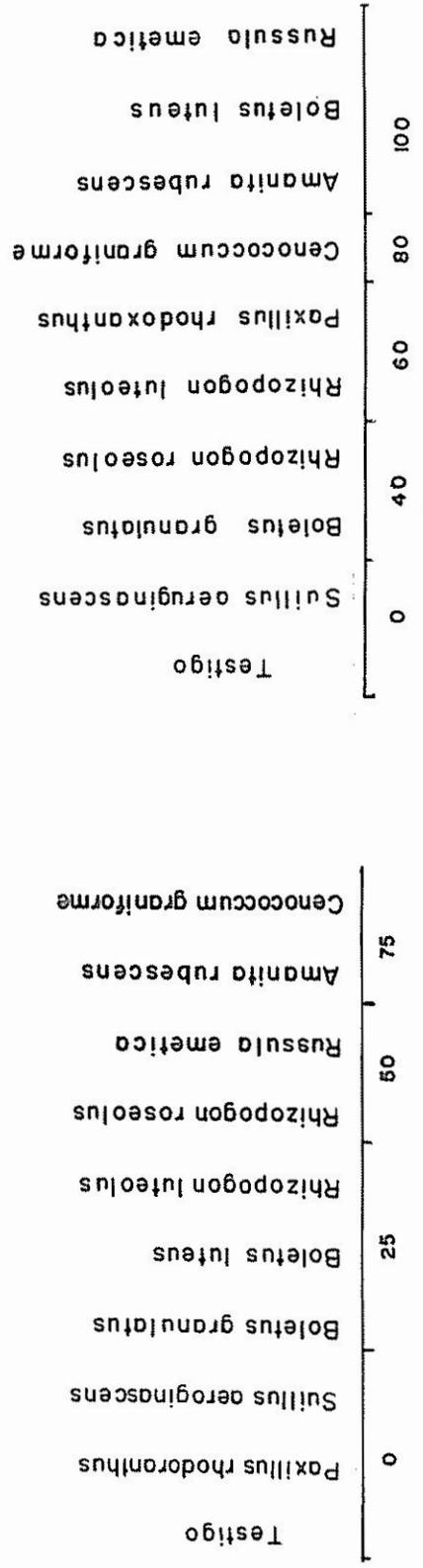
ESPECIE DE HONGO	E S P E C I E D E P I N O											
	<u>P. caribaea</u> var.			<u>P. oocarpa</u>			<u>P. pseudostrobilus</u>					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amanita rubescens	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Boletus luteus	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Paxillus rhodoxanthus	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
Russula emetica	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Rhizopogon roseolus	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Cenococcum graniforme	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Boletus granulatus	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Suillus aeruginascens	+	+	-									
Rhizopogon luteolus	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
TESTIGO	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+

P. oocarpa

P. pseudostrobilus



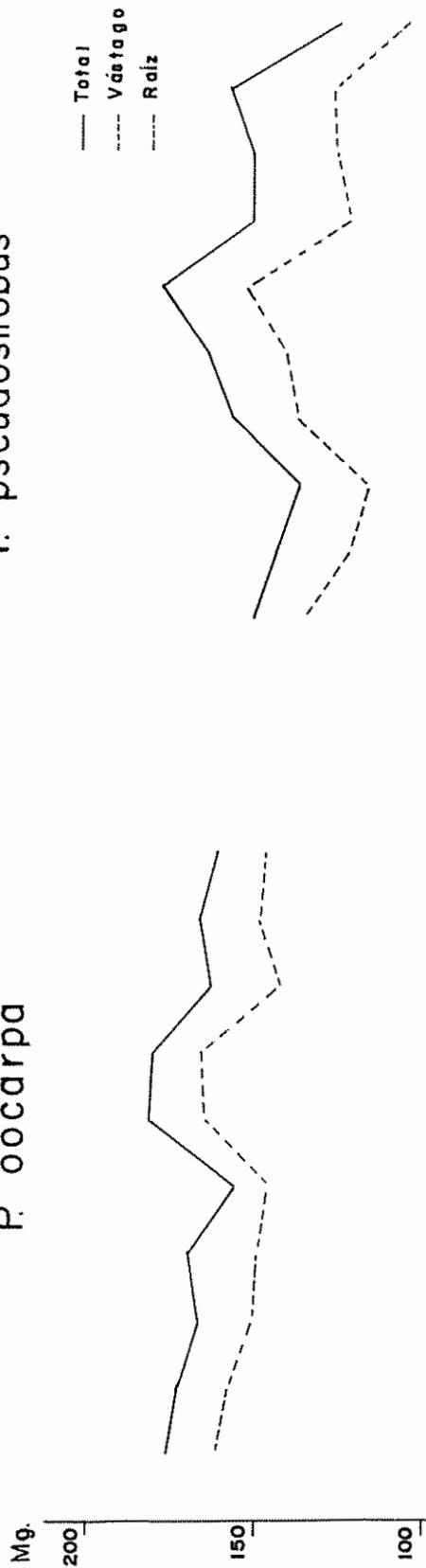
Tratamiento



Las especies de hongos figuran ordenadas según la "frecuencia de presencia" determinada.

Gráfico I. Peso fresco promedio de las plantas en el experimento N° I.

P. pseudostrabus



P. oocarpa

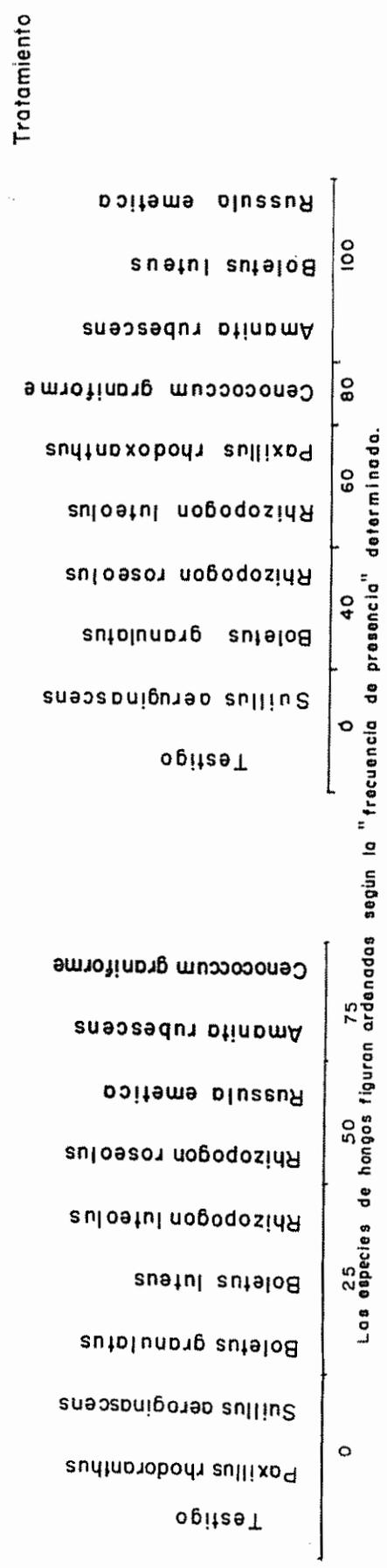
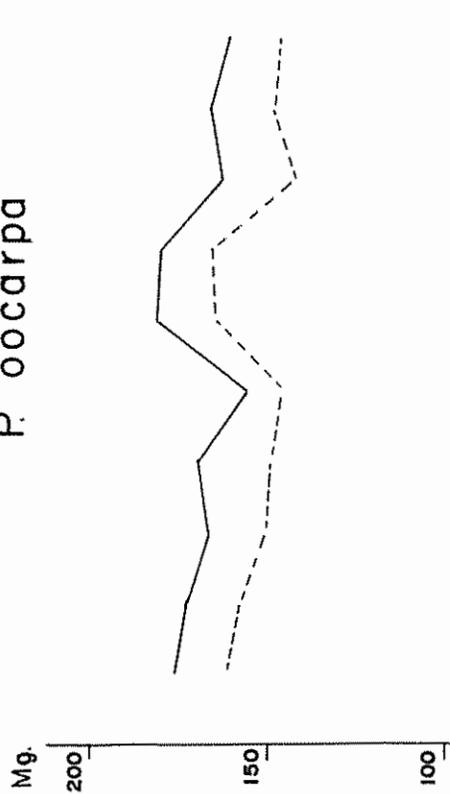


Gráfico 2. Peso seco promedio de las plantas en el experimento N° 1.

DISCUSION

En el capítulo correspondiente a Revisión de Literatura se hicieron algunas consideraciones acerca de las condiciones evidentemente anormales a que tanto las plantas como los hongos están expuestos en experimentos como el realizado bajo condiciones estériles. Asimismo se dijo que si un hongo es capaz de formar micorrizas bajo tales condiciones, se lo considera de aptitud micorrízica, pero que si no llega a formarlas, no debe por eso considerársele como inepto a tal fin.

Parecería inadecuado entonces, tratar de valorar la aptitud micorrizante de los hongos en base a los resultados obtenidos en tales condiciones. Se pensó no obstante que resultaría útil ofrecer mediante algún tipo de valoración de estos resultados, una guía orientadora que pudiese facilitar la selección de hongos a ser utilizados en futuros ensayos. Con ese criterio, se optó finalmente por la medida de lo que se pensó correspondería llamar "frecuencia de presencia" de micorrizas, que se presenta en el Cuadro 1.

La falta de consistencia de las determinaciones registradas en el Cuadro 1 dentro de cada tratamiento, podría explicarse, ya sea por el hecho de que no todas las plantas reaccionan necesariamente en la misma forma ante un tratamiento determinado, o bien por la circunstancia de que no todas las raicillas de una planta infectada se tornan micorrízicas. Los límites de la zona de la parte media de las raíces largas en que se produce con mayor frecuencia la infección micorrízica, y de donde como se explicó en el capítulo de Materiales y Métodos se tomaron las muestras, son muy difíciles de precisar y aún la distribución de la

infección suele resultar en ella irregular (29). Además, como antes quedó dicho, no pudieron observarse signos externos inequívocos de infección. Es factible, entonces, que algunas de las raicillas escogidas no aparecieran convertidas en micorrizas, aunque otras vecinas lo estuvieran. Por haberse aplicado una técnica uniforme en todos los casos, se estima sin embargo que las posibilidades de que tal cosa sucediera fueron las mismas en todas las repeticiones, con lo cual no se vería afectada la "frecuencia de presencia" determinada.

En la literatura se señala que el efecto de las micorrizas se hace visible en las plantas, bajo condiciones de campo, generalmente recién a partir de unos seis meses de producida la infección. Este efecto se manifiesta en diferencias en el desarrollo de las plantas infectadas respecto de las no infectadas. No obstante este antecedente, se consideró de interés en la presente investigación observar si realmente no se manifestaría la presencia de micorrizas en un lapso de tiempo menor, posibilitando en caso afirmativo la aplicación de un patrón de medida más apropiado para comparar la aptitud micorrizante de los distintos hongos. Con ese fin, en el Experimento N^o 1 se registraron los datos de los pesos fresco y seco total, y de los vástagos y raíces de las plantas de cada tratamiento. Con los promedios de tales valores se confeccionaron luego los Gráficos 1 y 2.

El Gráfico 3, como se explicó antes, se confeccionó en base a la relación entre los pesos medios de los vástagos y de las raíces. Se pensó que este último gráfico podría reflejar más cabalmente el efecto de las micorrizas, según una de las hipótesis formuladas para explicar el funcionamiento de estas asociaciones. Tal hipótesis establece que la función primordial de las micorrizas consistiría en poner a

disposición de la planta los elementos nutritivos que las raíces normales no tienen a su alcance, y que en otras condiciones la planta sólo podría aprovechar a expensas de un desarrollo radical excesivo. En otras palabras, la micorriza ahorraría a la planta producción de raíces, lo que se traduciría en una relación vástago-raíz más amplia en los casos de infección micorrízica que en los casos de ausencia de infección.

En los tres gráficos confeccionados, para cada una de las especies de pino que dio resultados comparables (no se consideró a P. caribaea var. hondurensis), se ordenaron las especies de hongos de acuerdo a la "frecuencia de presencia" previamente determinada. Se esperó que, de existir correlación, la misma se evidenciaría en los distintos gráficos por una tendencia determinada de las líneas.

En los Gráficos 1 y 2 la falta de una tendencia definida es bastante obvia. En el Gráfico 3 sucede algo parecido en el caso de P. oocarpa, mientras que, contrariamente a lo esperado, parece evidenciarse una tendencia negativa en el caso de P. pseudostrobus. Sin embargo, en un ensayo por ubicar en el gráfico los valores de la relación para cada muestra, se encontró excesiva dispersión, evidenciándose que la línea de los valores promedio no es muy representativa. Estas observaciones conducen finalmente a la interpretación de que, en las condiciones del Experimento Nº 1 no hubo correlación entre la presencia de micorrizas y el desarrollo de las plantas. Esta falta de correlación sería atribuible, según lo dicho antes, al corto tiempo transcurrido entre el comienzo de la infección micorrízica y la toma de datos.

La distinción hecha en el Cuadro 1 entre las secciones obtenidas de raicillas bifurcadas y las obtenidas de raicillas simples, no

bifurcadas, muestra al correlacionarla con las determinaciones efectuadas en cada caso, que en las condiciones del Experimento Nº 1 se produjo la bifurcación de las raicillas independientemente de la formación de micorrizas. La bifurcación se produjo aún en los testigos, que no figuran en el cuadro y, donde obvio es decirlo, no se observó presencia de micorrizas. Estos resultados corroborarían las referencias dadas en la literatura (5, 16, 34).

En el Cuadro 1 puede también observarse que la respuesta de las dos especies de pino consideradas, a los distintos tratamientos, acusa diferencias a veces bastante marcadas. Tal es el caso de Boletus luteus y de Paxillus rhodoxanthus. En otros casos las diferencias son leves, como con Amanita rubescens y Cenococcum graniforme. Sintomático es asimismo el caso de Suillus aeruginascens, que dio determinaciones negativas sin excepción. Estos resultados podrían interpretarse como un indicio del mayor o menor grado de especificidad de los hongos.

Al considerar los resultados obtenidos en la multiplicación de los hongos, expuestos en el capítulo correspondiente, paralelamente a la "frecuencia de presencia" de micorrizas en los distintos tratamientos, expuesta en el Cuadro 1, se observa que no hay una correspondencia directa entre ambas medidas. Así, si bien Amanita rubescens y Cenococcum graniforme figuran entre los hongos que acusaron el mejor y más rápido desarrollo en los subcultivos, y al mismo tiempo entre los que evidenciaron mayor "frecuencia de presencia" de micorrizas, no sucede lo mismo con Russula emetica y Rhizopogon luteolus, por ejemplo.

En el Experimento Nº 1 podría resultar por último interesante destacar que las especies de hongos que mejores resultados dieron fueron las provenientes de Estados Unidos, y que la mayor abundancia de

micorrizas se encontró sobre P. pseudostrobus. Esta observación conduce a pensar en la posible influencia de factores ecológicos. En el caso de P. pseudostrobus, por ejemplo, debe tenerse presente que esta especie habita naturalmente en una faja altitudinal relativamente elevada, con temperaturas medias próximas a las existentes en las áreas de ocurrencia natural de la mayor parte de los hongos ensayados.

En el Experimento Nº 2, la sola presencia de micorrizas en las plantas testigo presupone la existencia de contaminaciones y torna vano cualquier intento de análisis. Por ello sólo se exponen en el Cuadro 2 los resultados de las determinaciones efectuadas al microscopio. Con respecto a las contaminaciones en sí, resulta difícil, sin recurrir a técnicas especiales de aislación y cultivo, poder establecer su origen. Se considera factible alguna de estas posibilidades: a) salpicaduras de una maceta a otra; b) alguna otra forma casual de contacto entre las macetas; c) contaminación por medio de esporas transportadas por el viento desde otro lugar.

La primera de tales posibilidades no se descarta totalmente, aunque se tomaron las precauciones necesarias para evitar las salpicaduras. La última se incluye en virtud de las referencias dadas en la literatura (29). No se ha encarado, sin embargo, ningún estudio tendiente a establecer la posible ocurrencia de hongos de aptitud micorrizante en las proximidades del sitio en que estuvo establecido el experimento.

CONCLUSIONES

Como conclusiones de la presente investigación pueden derivarse las siguientes:

1. Bajo condiciones de cultivo estéril similares a las aplicadas en el Experimento Nº 1, se comportan como micorrizantes los siguientes hongos: Amanita rubescens, Boletus luteus, Russula emetica, Rhizopogon roseolus, Cenococcum graniforme, Boletus granulatus y Rhizopogon luteolus sobre Pinus oocarpa; estos mismos hongos y Paxillus rhodoxanthus sobre P. pseudostrobus. No fue posible determinar, por dificultades experimentales, hongos micorrizantes sobre P. caribaea var. hondurensis.
2. Sin pretender establecer una verdadera clasificación de la aptitud micorrizante de los hongos citados, se establece un ordenamiento de los mismos basado en la "frecuencia de presencia" determinada en cada caso, que se estima podrá servir de orientación en futuros experimentos. Este ordenamiento sería en el caso de P. oocarpa:
 - 1) Amanita rubescens y Cenococcum graniforme; 2) Russula emetica y Rhizopogon roseolus; 3) Boletus luteus, Boletus granulatus y Rhizopogon luteolus. En el caso de P. pseudostrobus sería: 1) Amanita rubescens, Boletus luteus y Russula emetica; 2) Cenococcum graniforme; 3) Paxillus rhodoxanthus y Rhizopogon luteolus; 4) Rhizopogon roseolus y Boletus granulatus.
3. Bajo condiciones de cultivo no estéril similares a las aplicadas en el Experimento Nº 2, se establecen contaminaciones con hongos micorrizantes.

4. Los resultados obtenidos en el Experimento N^o 1 sugieren adicionalmente que:
- a. En los ensayos sobre formación de micorrizas influyen factores ecológicos propios tanto de la planta como de los hongos ensayados.
 - b. No parece existir correlación entre el tipo y velocidad de crecimiento de los hongos en cultivos puros y su capacidad para formar micorrizas bajo condiciones experimentales.
 - c. Resulta evidente que la bifurcación de las raicillas puede producirse también, bajo condiciones experimentales, sin que ocurra infección micorrízica.
 - d. Si se desea correlacionar en los experimentos la presencia de micorrizas con los efectos que ellas producen en las plantas, la duración de los mismos debe ser suficientemente larga. Esto traería aparejada la necesidad de diseñar un tipo de acondicionamiento más adecuado para las plantas.
 - e. Para reducir los efectos de la manifiesta inconsistencia en las determinaciones de cada tratamiento, debería asegurarse un número suficientemente grande de muestras en cada uno.

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo principal de estudiar el comportamiento como micorrizantes, bajo condiciones controladas, de nueve especies de hongos inoculados al estado de cultivos puros sobre plantas de tres especies de pinos centroamericanos, ensayando todas las combinaciones posibles entre ellos.

Los pinos utilizados fueron: P. caribaea var. hondurensis, P. oocarpa y P. pseudostrobus. Se ensayaron las siguientes especies de hongos: Amanita rubescens, Boletus luteus, Paxillus rhodoxanthus, Russula emetica, Rhizopogon roseolus, Cenococcum graniforme, Boletus granulatus, Suillus aeruginascens y Rhizopogon luteolus. Los cultivos puros se obtuvieron de laboratorios especializados de Estados Unidos y Holanda.

Se llevaron a cabo dos experimentos: uno bajo condiciones estériles, y otro bajo condiciones no estériles. En el primer experimento, las plantas se hicieron crecer dentro de frascos Erlenmeyer de 500 cc. Como sustrato se utilizó una mezcla 1:1 de arena y vermiculita embebida en solución nutritiva Melin-Norkrans, que se esterilizó en autoclave una vez acondicionada en los frascos. Las semillas, previa desinfección en solución de bicloruro de mercurio 1:1000 durante 10 minutos, se sembraron directamente en el sustrato. La inoculación de los hongos se efectuó luego de transcurrido 1 1/2 mes de la siembra, bajo la forma de suspensiones miceliales en agua esterilizada. En el momento de la inoculación se añadió una cantidad adicional de solución nutritiva. Después de la inoculación, los frascos se mantuvieron en el invernadero con la base sumergida en un baño de agua, a fin de prevenir las

temperaturas excesivas. El experimento concluyó a los cuatro meses de la inoculación.

En el experimento bajo condiciones no estériles se efectuó la siembra directa de las semillas desinfectadas en macetas de cartón de aproximadamente 9 x 9 cm, sobre un sustrato de vermiculita sólo. Una vez por semana se añadió solución nutritiva, manteniendo el resto del tiempo la humedad necesaria mediante riegos con agua de grifo. La inoculación se efectuó a los dos meses de la siembra por medio de suspensiones miceliales. El experimento concluyó a los 4 1/2 meses de la inoculación.

La multiplicación de los hongos para la preparación de los inóculos se realizó en medio de Hagem, sólido y líquido.

En el experimento bajo condiciones estériles cada tratamiento incluyó entre cuatro y cinco plantas, según los resultados de la germinación. En P. caribaea var. hondurensis sólo fue posible, debido a la excesiva irregularidad, aplicar dos tratamientos de cuatro muestras cada uno. En el otro experimento pudo disponerse de seis plantas para cada tratamiento.

En la toma de muestras se incluyeron todas las plantas del experimento bajo condiciones estériles, y la mitad en el otro experimento. La presencia de micorrizas se determinó en base a la observación microscópica de secciones de raicillas. Para la preparación de las secciones, las raicillas fueron sometidas a fijación en FAA, deshidratación en n-butanol e imbibición e infiltración en parafina. Los cortes, de sección transversal, se hicieron con un micrótopo rotativo, a un espesor de 12 micrones. Las secciones se colorearon con la combinación de contraste safranina-verde rápido.

Como datos complementarios se registraron el peso final de las plantas en el experimento bajo condiciones estériles, y las diferencias en la altura del vástago en el experimento bajo condiciones no estériles.

Los resultados logrados indican que bajo condiciones de cultivo estéril similares a las aplicadas, se comportan como micorrizantes, sobre P. oocarpa, los siguientes hongos: Amanita rubescens, Boletus luteus, Russula emetica, Rhizopogon roseolus, Cenococcum graniforme, Boletus granulatus y Rhizopogon luteolus. Estos mismos hongos y además Paxillus rhodoxanthus se comportan también como micorrizantes sobre P. pseudostrobus. A causa de dificultades experimentales no fue posible hacer determinaciones completas sobre P. caribaea var. hondurensis.

Sólo a título de orientación para futuros experimentos se presenta un ordenamiento de los hongos ensayados, basado en la "frecuencia de presencia" de micorrizas determinada para cada tratamiento. Para P. oocarpa el ordenamiento sería el siguiente: 1) Amanita rubescens y Cenococcum graniforme; 2) Russula emetica y Rhizopogon roseolus; 3) Boletus luteus, Boletus granulatus y Rhizopogon luteolus. Para P. pseudostrobus el ordenamiento sería como sigue: 1) Amanita rubescens, Boletus luteus y Russula emetica; 2) Cenococcum graniforme; 3) Paxillus rhodoxanthus y Rhizopogon luteolus; 4) Rhizopogon roseolus y Boletus granulatus.

Comparaciones efectuadas entre la "frecuencia de presencia" de micorrizas y los pesos de las plantas en el experimento bajo condiciones estériles, no mostraron correlación, posiblemente debido al corto tiempo transcurrido entre el comienzo de la infección micorrízica y las

observaciones. Tampoco se encontró correlación entre la "frecuencia de presencia" y el tipo de crecimiento de los hongos en cultivos puros.

Los resultados hallados mostraron asimismo la posibilidad de que ocurra bifurcación de raicillas no acompañada de formación de micorrizas. Los resultados hacen pensar además en la posibilidad de influencias debidas a la ecología de las plantas y los hongos usados.

Bajo condiciones de cultivo no estéril se encontró presencia de micorrizas en las plantas testigo, evidenciando la ocurrencia de contaminaciones. Estas pueden haberse producido por esporas traídas por el aire o por contacto entre las macetas.

SUMMARY

The main objective of the present investigation was to determine the mycorrhizal behavior, under controlled conditions, of nine fungal species inoculated in the form of pure cultures on three Central American pine species, trying all possible combinations between them.

The pine species used were: P. caribaea var. hondurensis, P. oocarpa and P. pseudostrobus. The fungal species were: Amanita rubescens, Boletus luteus, Paxillus rhodoxanthus, Russula emetica, Rhizopogon roseolus, Cenococcum graniforme, Boletus granulatus, Suillus aeruginascens and Rhizopogon luteolus. The pure cultures were introduced from specialized laboratories in United States and Holland.

Two experiments are carried out: one under sterile conditions, and the other under non-sterile conditions. In the former experiment, seedlings were raised in 500 ml Erlenmeyer flasks. A 1:1 sand-vermiculite substratum was placed in the flasks and imbibed with Melin-Norkrans nutritive solution; the flasks were then autoclaved. Seeds which had been disinfected in 1:1000 mercuric chloride solution for 10 minutes were sown directly on the substratum. The fungi were inoculated after 1 1/2 months, by means of mycelial suspensions in sterilized water. An additional amount of nutritive solution was added at that time. After inoculation, the flasks were maintained in the greenhouse, with their bases immersed in a water bath in order to prevent excessive temperatures. The experiment ended 4 months after the inoculation.

In the experiment under non-sterile conditions treated seeds were sown directly in the vermiculite substratum contained in 9 x 9 cm

cardboard pots. Nutrient solution was added every week and the pots were sprinkled with water in order to maintain their moisture. Inoculation was made 2 months after sowing, by means of mycelial suspensions. The experiment ended 4 1/2 months after the inoculation.

Fungal subcultures for preparation of inocula were made on solid and liquid Hagem medium.

Depending on the number of seeds which germinated successfully, each treatment included from 4 to 5 plants in the experiment under sterile conditions. Because of excessively irregular germination, in P. caribaea var. hondurensis it was possible to apply only two treatments, with 4 samples each. In the other experiment 6 plants were available for each treatment.

The final evaluation included all the seedlings in the experiment under sterile conditions, and half of those in the other experiment. The presence of mycorrhiza was determined by microscopic observation of sections of short roots. Section preparation was made by fixing in FAA solution, dehydrating in n-butyl alcohol and embedding and infiltrating in paraffin. Cross sections 12 microns thick were cut with a rotary microtome. Safranin fast-green combination was used for differential staining.

As complementary data, records were taken of the final weight of plants in the experiment under sterile conditions, and of the differences in height of shoots in the experiment under non-sterile conditions.

Results indicate that under sterile conditions similar to those applied, the following fungi have a mycorrhizal behavior on P. oocarpa: Amanita rubescens, Boletus luteus, Russula emetica, Rhizopogon

roseolus, Cenococcum graniforme, Boletus granulatus and Rhizopogon luteolus. The same fungi and Paxillus rhodoxanthus have a mycorrhizal behavior on P. pseudostrobis. Owing to experimental difficulties it was not possible to complete determinations on P. caribaea var. hondurensis.

As an orientation for future experiments, one arrangement of the fungi is presented, based on the "frequency of presence" of mycorrhizae determined in each treatment. For P. oocarpa the arrangement could be the following: 1) Amanita rubescens and Cenococcum graniforme; 2) Russula emetica and Rhizopogon roseolus; 3) Boletus luteus, Boletus granulatus and Rhizopogon luteolus. For P. pseudostrobis the arrangement could be as follows: 1) Amanita rubescens, Boletus luteus and Russula emetica; 2) Cenococcum graniforme; 3) Paxillus rhodoxanthus and Rhizopogon luteolus; 4) Rhizopogon roseolus and Boletus granulatus.

Comparisons made between the "frequency of presence" of mycorrhizae and plant weight in the experiment under sterile conditions, showed no correlation, possibly because of the short time between the start of mycorrhizal infection and observations. Neither was a correlation found between the presence of mycorrhizae and the growth pattern of fungi in pure cultures.

Results showed, likewise, the possibility of the occurrence of forked short roots in the absence of mycorrhizal formation. The results tend to point out the possibility of influences owing to ecology of plants and fungi used.

Under non-sterile conditions, presence of mycorrhizae in the controls was indicated, thus proving that contamination had occurred either through air-borne spores or through contact between the pots.

LITERATURA CITADA

1. BRISCOE, CH. B. Early results of mycorrhizal inoculation in Puerto Rico. *Caribbean Forester* 20(3/4):73-77. 1959.
2. BRYAN, W. C. y ZAK, B. Synthetic culture of mycorrhizae of southern pines. *Forest Science* 7(2):123-129. 1961.
3. COHEN, I. y DOAK, K. D. The fixing and staining of Liriodendron tulipifera root tips and their mycorrhizal fungus. *Stain Technology* 10:25-32. 1935.
4. DOAK, K. D. Pine root reaction in sterile culture to mycorrhizal and other fungi. *American Midland Naturalist* 54(2):443-451. 1955.
5. GOSS, R. W. Mycorrhizae of ponderosa pine in Nebraska grassland soils. Nebraska Agricultural Experiment Station. Research Bulletin nº 192. 1960. 47 p.
6. HACSKAYLO, E. A study of the roots of Pinus virginiana in relation to certain Hymenomycetes suspected of being mycorrhizal. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 41(12):399-400. 1951.
7. _____ Pure culture synthesis of pine mycorrhizae in Terra-Lite. *Mycologia* 45(6):971-975. 1953.
8. _____ Mycorrhizae of trees with special emphasis on physiology of ectotrophic types. *Ohio Journal of Science* 57(6):350-357. 1957.
9. _____ y PALMER, J. G. Hymenomycetous species forming mycorrhizae with Pinus virginiana. *Mycologia* 47(1):145-147. 1955.
10. HARLEY, J. L. The biology of mycorrhizae. London, Hill, 1959. 233 p.
11. HATCH, A. B. The physical basis of mycotrophy in the genus Pinus. Black Rock Forest. Bulletin nº 6. 1937. 168 p.
12. _____ The role of mycorrhizae in afforestation. *Journal of Forestry* 34(1):22-29. 1936.
13. JACKSON, L. W. R. Method for differential staining of mycorrhizal roots. *Science* 105(2724):291-292. 1947.
14. KELLEY, A. P. Mycotrophy in plants. Waltham, Mass., *Chronica Botanica*, 1950. 223 p.

15. LEVISOHN, IDA. Effects of mycorrhiza on tree growth. *Soil and Fertilizers* 21(2):73-82. 1958.
16. _____ Root forking of pine seedlings growing under non-sterile conditions. *New Phytologist* 59(3):326-331. 1960.
17. McARDLE, R. E. The relation of mycorrhizae to conifer seedlings. *Journal of Agricultural Research* 44(4):287-316. 1932.
18. McCOMB, A. L. The relation between mycorrhizae and the development and nutrient absorption of pine seedlings in a prairie nursery. *Journal of Forestry* 36(11):1148-1154. 1938.
19. MACDONEL MARTINEZ, CARMEN E. Formaciones micorrízicas en pinos de semillero (*Pinus montezumae* Lamb., y *P. patula* Schl. et Cham). México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Boletín Técnico nº 9. 1963. 44 p.
20. MELIN, E. Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. In *Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*. s.l., s.e., 1936. v. 4, pp. 1015-1108.
21. _____ Mycorrhiza. In *Ruhland, W., ed. Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Berlin, Springer-Verlag, 1959. v. 11, pp. 605-638.
22. _____ Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 4:325-346. 1953.
23. _____ Physiological aspects of mycorrhizae of forest trees. In *Kozlowski, T. T., ed. Tree growth*. New York, Ronald, 1962. pp. 247-263.
24. _____ y DAS, V. S. R. Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 7(4):851-858. 1954.
25. MUKHERJI, S. K. y THAPAR, H. S. Mycorrhizae in seven exotic conifers growing in New Forest (Dehra Dun). *Indian Forester* 87(8):484-488. 1961.
26. NORKRANS, BIRGITTA. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. *Svensk Botanisk Tidskrift* 43(2/3):485-490. 1949.
27. RAETS, G. H. Apuntes preliminares sobre el desarrollo del *Pinus caribaea* en el vivero en relación con la presencia o ausencia de la micorriza. Venezuela. Instituto Forestal Latinoamericano. Boletín nº 9, 1962. pp. 1-15.
28. RAYNER, M. C. Mycorrhiza; an account of non-pathogenic infection by fungi in vascular plants and Bryophytes. London, Wheldon & Wesley, 1927. 246 p.

29. ROBERTSON, N. F. Studies on the mycorrhiza of Pinus sylvestris. I. The pattern of development of mycorrhizal roots and its significance for experimental studies. *New Phytologist* 53(2):253-283. 1954.
30. ROUTIEN, J. B. y DAWSON, R. F. Some interrelationships of growth, salt absorption, respiration, and mycorrhizal development in Pinus echinata Mill. *American Journal of Botany* 30(6):440-451. 1943.
31. SANTORO, T. y CASIDA, L. E., Jr. Improved method for obtaining vegetative growth of mycorrhizal and other slow growing fungi. *Journal of Bacteriology* 78(3):449-450. 1959.
32. SANTOS, NATALINA FERREIRA DOS y SANTOS, ANICETA C. DOS. Ensaio de fixação e coloração de micorrizas. *Revista Agronómica (Portugal)* 36:74-88. 1948.
33. SASS, J. E. *Botanical microtechnique*. 3rd ed. Ames, Iowa, Iowa State College Press, 1958. 228 p.
34. SLANKIS, V. The role of auxin and other exudates in mycorrhizal symbiosis of forest trees. In Thimann, K. V., ed. *The physiology of forest trees*. New York, Ronald, 1957. pp. 427-443.
35. TAKACS, E. A. Importancia de las micorizas en el cultivo de pinos. *Revista Forestal Argentina* 2(3):98-102. 1958.
36. _____ Inoculación de especies de pinos con hongos formadores de micorrizas. *Silvicultura (Uruguay)* 11(15):5-17. 1961.
37. TRAPPE, J. M. Cenococcum graniforme; its distribution, ecology, mycorrhiza formation, and inherent variation. Ph. D. Thesis. Seattle, Wash., University of Washington, 1962. 148 p.
38. _____ Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review* 28(4):538-606. 1962.
39. ULRICH, J. M. Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 13(3):429-443. 1960.
40. VEGA CONDORI, L. Introducción de coníferas a diversas zonas ecológicas de Costa Rica y efecto de las micorrizas en su crecimiento inicial. Tesis Mag. Agr. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1962. 117 p. (Mimeografiada)
41. VOZZO, J. A. y HACSKAYLO, E. Mycorrhizal fungi on Pinus virginiana. *Mycologia* 53(5):538-539. 1961.

42. WILDE, S. A. Mycorrhizal fungi: their distribution and effect on tree growth. *Soil Science* 78(1):23-31. 1954.
43. YOUNG, H. E. Mycorrhizae and growth of Pinus and Araucaria; the influence of different species of mycorrhiza-forming fungi on seedling-growth. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* 6:21-25. 1940.

A P E N D I C E



Foto 1. Forma en que se acondicionaron los frascos en el invernadero en el Experimento N^o 1.

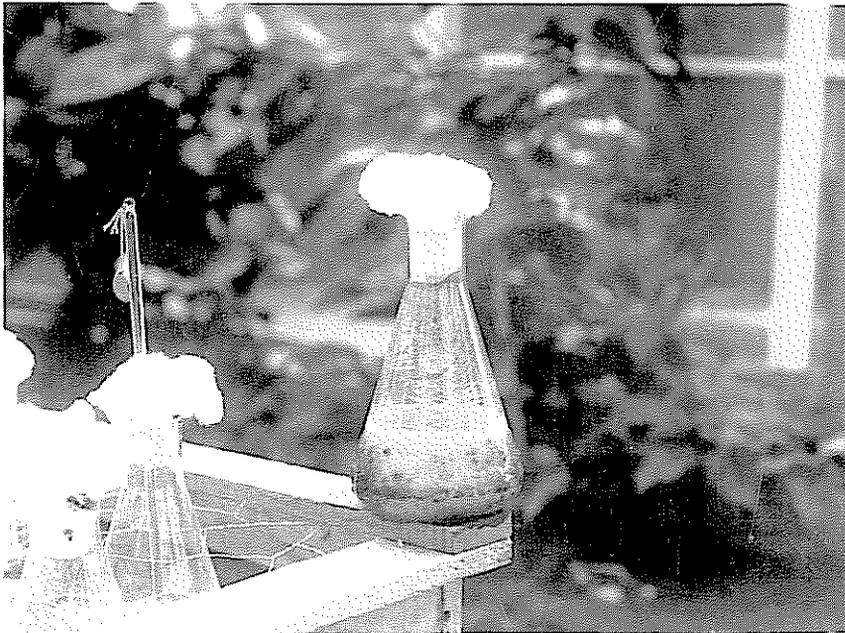


Foto 2. Detalle de un frasco de cultivo en el Experimento N^o 1.



Foto 3. Forma en que se acondicionaron las plantas en el Experimento Nº 2.



Foto 4. Raicillas bifurcadas de una planta de P. pseudostrobus inoculada con el hongo Paxillus rhodoxanthus. Condiciones estériles. Aprox. X 3.

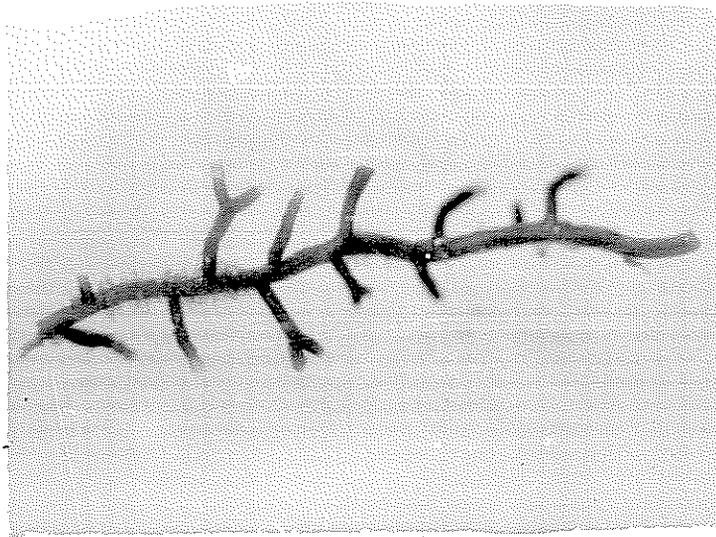


Foto 5. Raicillas bifurcadas de una planta de P. pseudostrobus inoculada con el hongo Boletus luteus. Condiciones estériles. Aprox. X 7.

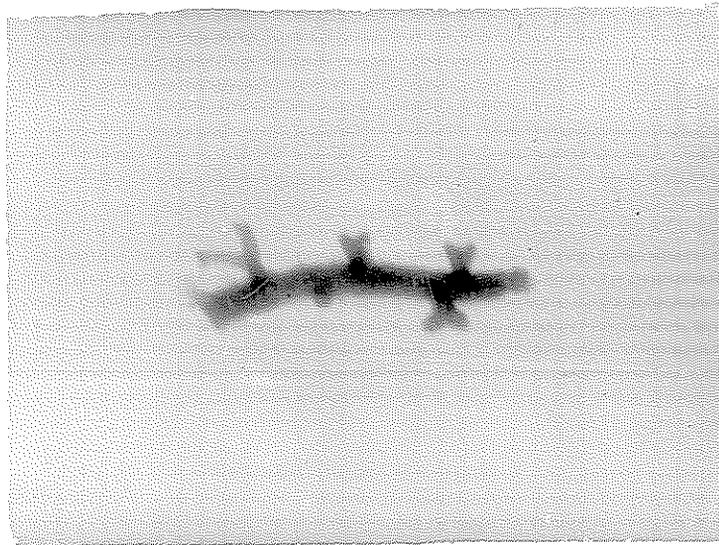


Foto 6. Raicillas bifurcadas de una planta de P. caribaea var. hondurensis inoculada con el hongo Suillus aeruginascens. Condiciones estériles. Aprox. X 8 (la bifurcación no estuvo acompañada de infección micorrízica).



Foto 7. Raicillas bifurcadas de una planta de P. oocarpa inoculada con el hongo Rhizopogon roseolus. Condiciones no estériles. Aprox. X 9.

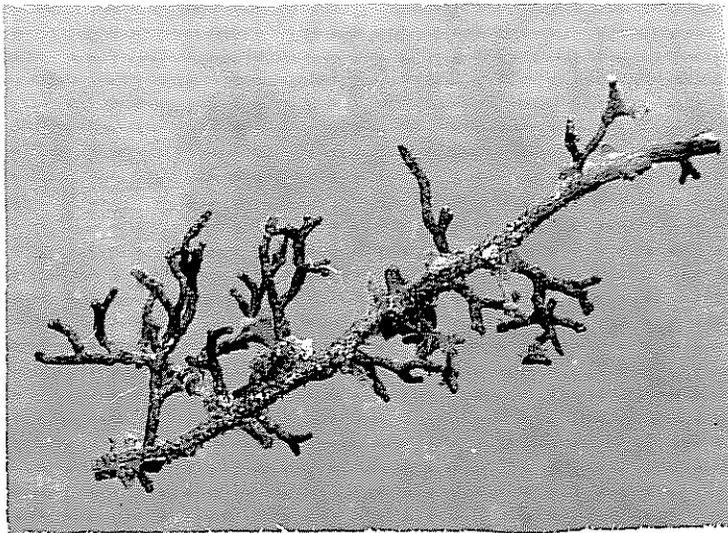


Foto 8. Raicillas bifurcadas de una planta de P. caribaea var. hondurensis inoculada con el hongo Rhizopogon roseolus. Condiciones no estériles. Aprox. X 6.

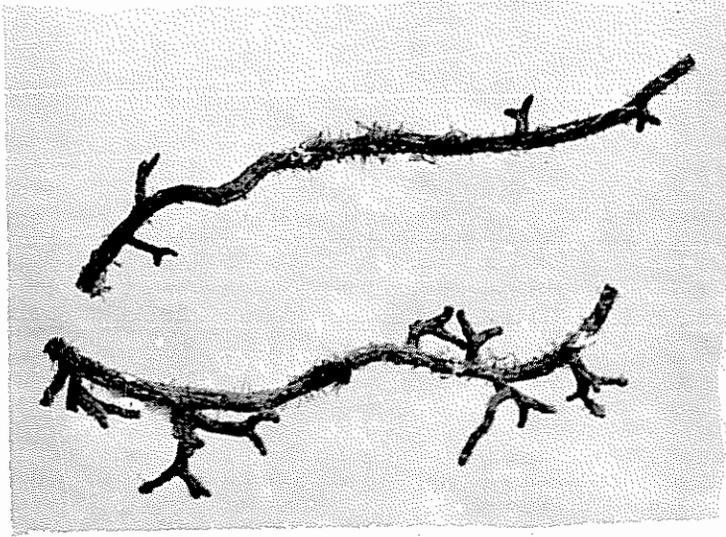


Foto 9. Raicillas bifurcadas de una planta de P. pseudostrobus inoculada con el hongo Boletus granulatus. Condiciones no estériles. Aprox. X 7.

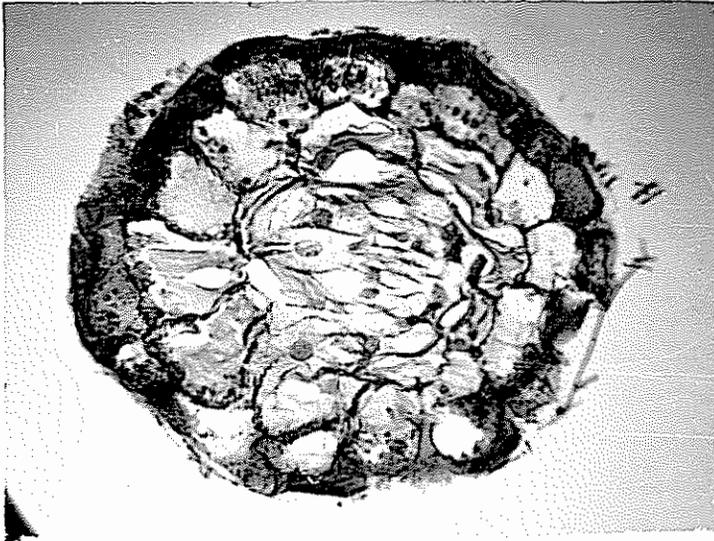


Foto 10. Sección transversal de una raicilla micorrízica en P. pseudostrobus inoculado con el hongo Amanita rubescens. Condiciones estériles (nótense trozos de micelio a un costado del corte).

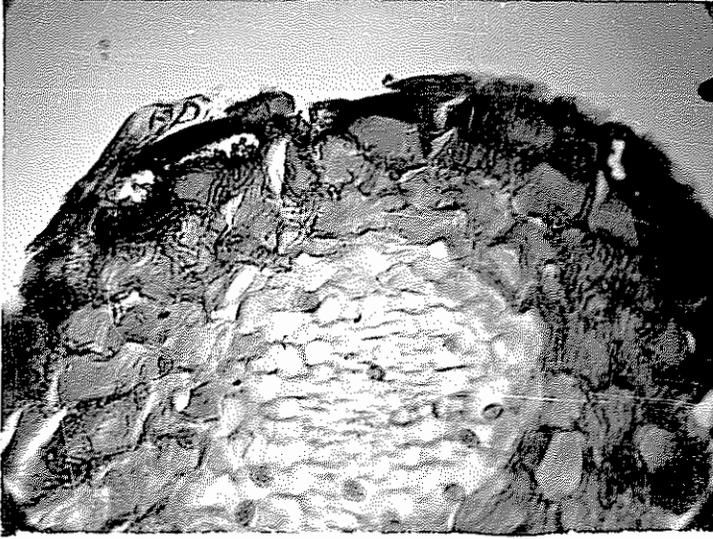


Foto 11. Sección transversal de una raicilla micorrízica en P. pseudostrobus inoculado con el hongo Cenococcum graniforme. Condiciones estériles.

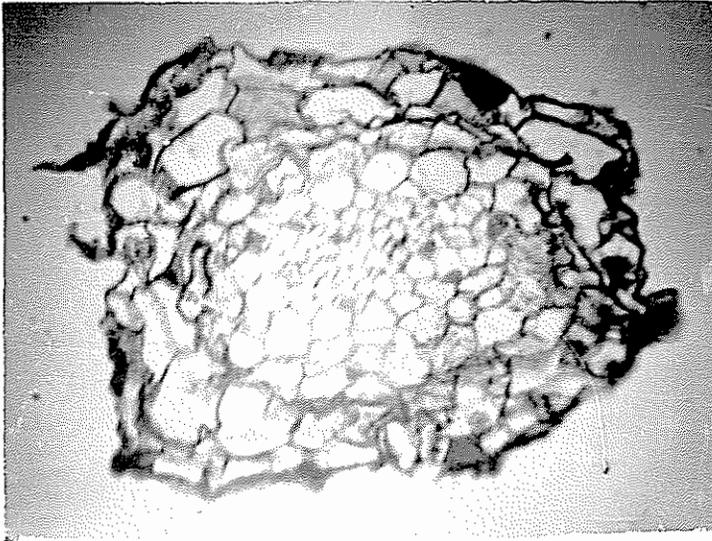


Foto 12. Sección transversal de una raicilla no micorrízica de una planta testigo de P. pseudostrobus. Condiciones estériles.

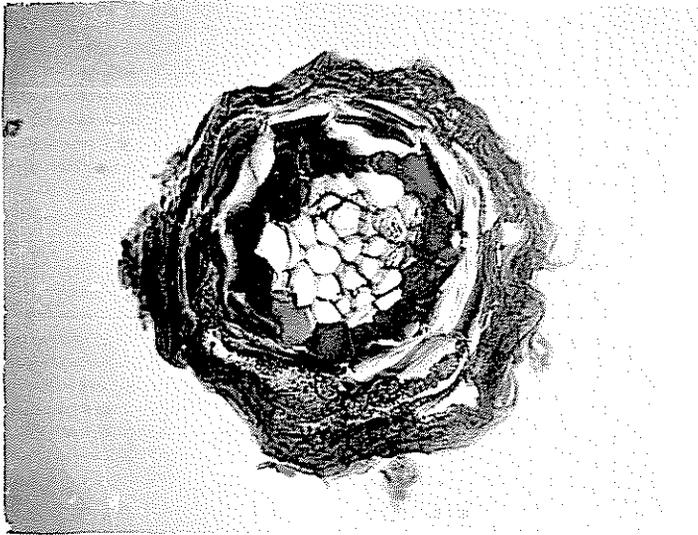


Foto 13. Sección transversal de una raicilla micorrizica en P. oocarpa inoculado con el hongo Boletus luteus. Condiciones no estériles.

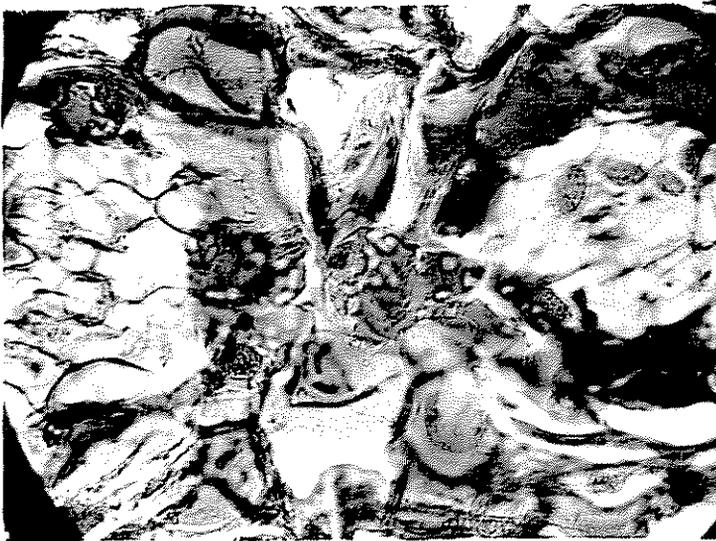


Foto 14. Sección transversal en el origen de una bifurcación de una raicilla micorrizica, en P. oocarpa inoculado con el hongo Cenococcum graniforme. Condiciones no estériles.

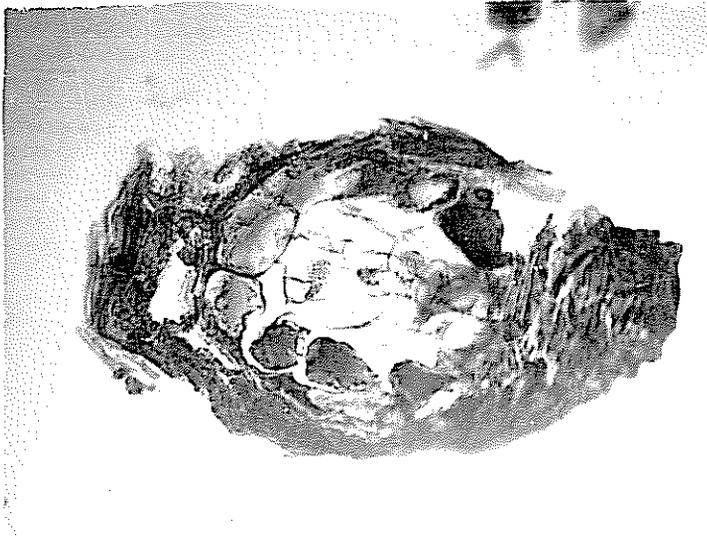


Foto 15. Sección transversal de una raicilla micorrízica (!) de una planta testigo de P. caribaea var. hondurensis. Condiciones no estériles.