

HONGOS ECTOMICORRÍDICOS EN *Eucalyptus grandis*

G. Malvárez,* G. Major,** V. Curbelo,* y L. Frioni *

Aceptado: 4 de octubre de 1996

RESUMEN

Las micorrizas constituyen asociaciones simbióticas que permiten un activo intercambio nutricional entre raíces y distintos grupos de hongos. Las especies forestales de gran valor económico en el país como pinos y eucaliptos presentan micorrizas.

Los objetivos de este trabajo fueron: obtener una colección de hongos ectomicorrícicos a partir de muestreos de diferentes bosques de pinos y de eucaliptos del país y de especímenes cedidos por centros de colección, evaluar las características del crecimiento de uno de los aislamientos en diferentes medios de cultivo y verificar la capacidad simbiótica de las distintas colecciones de hongos por inoculación en plántulas de *Eucalyptus grandis* obtenidas a partir de semillas y en plantas micropropagadas.

Se logró aislar hongos a partir de carpóforos de distintas zonas empleando varios medios de cultivo. Un 64% de ellos se identificó como *Pisolithus tinctorius*, un 27% como *Scleroderma spp.* y el resto como especies de *Boletus spp.* y *Amanita muscaria*.

Se verificó que de los medios empleados Saubouraud (S) y Extracto de Malta (EM) fueron aptos para los aislamientos, mientras que el Melin Norkans Modificado (MNM) fue más útil para el mantenimiento de los cultivos. Los estudios en un aislamiento nativo mostraron que su velocidad de crecimiento se mantuvo constante hasta la quinta semana (1,50 y 1,60 cm de micelio por semana en medios S y MNM sólidos, respectivamente). En medio líquido, el crecimiento fue mayor en medio S en relación a MNM (8,30 y 5,40 mg de micelio seco/día). En este último medio se llegó más rápidamente a la fase estacionaria consecuencia de una acidificación marcada que inhibió el crecimiento.

Se logró sintetizar ectomicorrizas *in-vitro* en plántulas de semillas de *E. grandis* con distintos aislamientos de hongos nativos.

PALABRAS CLAVES: Ectomicorrizas, *Eucalyptus grandis*, hongos ectomicorrícicos.

SUMMARY

ECTOMYCORRHIZAL FUNGI IN *Eucalyptus grandis*

Mycorrhizae are symbiotic associations that make possible an active exchange of nutrients between roots and different groups of fungi. The forest species of importance in our country such as pine and eucalypt present mycorrhizae.

The objectives of this work were isolate ectomycorrhizal fungi from samples obtained in pine and eucalypt forests, evaluate growth characteristics of these isolates in different growth culture media and verify the symbiotic characteristics of the isolates with eucalypt seedlings and micropropagated plantules.

Many isolates were obtained from sporocarps, 64% of them were identified as *Pisolithus tinctorius*, 27% as *Scleroderma spp.* and the rest corresponded to species of *Boletus spp.* and *Amanita muscaria*.

The Sabouraud (S) and Malt Extract (ME) culture media had the best performance for the isolation while the Modified Melin Norkans (MNM) was best for maintenance. The growth studies of one native isolate showed that the growth rate was constant up to the fifth week in solid media (in S and MNM). In liquid media, the growth was more important in S medium in relation to MNM (8.30 and 4.5 mg of dry mycelium/day). The culture in MNM got faster to the stationary phase due to the acidification of the media (pH 1.8).

Synthesis of ectomycorrhizae was obtained between *Eucalyptus* seedlings and several *Pisolithus* isolates.

KEY WORDS: Ectomycorrhizae, *Eucalyptus grandis*, ectomycorrhizal fungi.

*Laboratorio de Microbiología, ** Laboratorio de Biotecnología.

Facultad de Agronomía.

Correspondencia a:

Lillán Frioni. Facultad de Agronomía. Av. Garzón 780 CP 12900.

Montevideo, Uruguay. FAX 598 2 3093004,

E-mail: lfrioni@micro.edu.uy

INTRODUCCION

Las micorrizas constituyen asociaciones simbióticas mutualísticas entre hongos y raíces de plantas superiores. Salvo contadas excepciones, la planta suministra al hongo fuentes de carbono además de un nicho ecológico protegido. Por su parte el hongo ayuda a absorber agua y nutrientes minerales del suelo, limita la suberización y protege a la planta contra microorganismos patógenos (Azcón y Barea, 1988).

La gran mayoría de las plantas que viven en la superficie terrestre presentan estas asociaciones, aunque evolutivamente se han diferenciado distintos tipos, que se reconocen según sus caracteres morfo-anatómicos. Se distinguen las *endomycorrizas*, donde las hifas penetran en el interior de las células de la corteza y las *ectomycorrizas*, en las cuales el hongo, normalmente de micelio tabicado, forma un manto de hifas que rodea la raíz sin penetrar las células de la corteza, con desarrollo intercelular (red de Hartig). Un tercer tipo, las *extendomycorrizas*, presentan caracteres de las dos anteriores (Honrubia *et al.*, 1992). Las especies forestales presentan por lo general ecto y endomycorrizas (Mikola, 1973 y Moser y Haselwandter, 1983).

Los aislamientos de hongos ectomicorrícicos se pueden realizar a partir de carpóforos, ectomycorrizas, esclerocios, rizomorfs o esporas sexuales. Los carpóforos son las estructuras más utilizadas debido a que a partir de ellos se puede conocer la especie fúngica que se aísla.

La selección y la inoculación de plantines con hongos micorrícicos tiene como objetivo introducir simbiontes de mayor eficiencia y competitividad que los nativos presentes en los soportes usados en los viveros (Moser y Haselwandter, 1983).

Una selección cuidadosa de hongos ectomicorrícicos se reconoce como primer paso a efectuar en todo programa de inoculación.

Los pasos a seguir incluyen el aislamiento y cultivo en estado puro de hongos recolectados en zonas de bosques establecidos. Luego es necesario verificar el carácter ectomicorrícico de estos hongos y seleccionar aquellos que ejerzan mayor efecto beneficioso sobre las especies vegetales en estudio.

Los criterios para la selección de hongos micorrícicos para la utilización en programas de micorrización controlada son: crecimiento rápido en medios de cultivo, efectividad en la formación de micorrizas, adaptabilidad ecológica, capacidad competitiva, formación de micorrizas en diferentes huéspedes y mejor desempeño de las mudas en el campo (Trappe y Fogel, 1977, Marx y Kenney, 1982).

Los ensayos de eficiencia evalúan el efecto de la simbiosis en diferentes parámetros del crecimiento del vegetal como son altura, diámetro del tallo, volumen de la planta, nivel de nutrientes. El siguiente paso lo constituye la preparación de inoculantes.

Las ectomycorrizas son características de todas las especies de *Eucalyptus* estudiados. Sin embargo, no se ha

desarrollado en la región hasta el presente un programa masivo de inoculación a pesar de la evidencia de estimulación del crecimiento (Malajczuk *et al.*, 1986). Los ensayos de inoculación se han realizado hasta el momento bajo condiciones controladas y existen pocos datos sobre la eficiencia en vivero y luego del trasplante (Arruda *et al.*, 1988).

Eucalyptus grandis es considerada una de las especies más importantes promovidas en Uruguay debido a su velocidad de crecimiento. Actualmente se lleva a cabo en el país un programa de mejoramiento genético de esta especie, con el objetivo final de solucionar el problema de abastecimiento de semilla mejorada. Trabajos en el área de propagación vegetativa y pruebas de progenie de los árboles selectos se vienen desarrollando en la Facultad de Agronomía (Major *et al.*, 1993).

El éxito de la producción de mudas vigorosas y del establecimiento de reforestaciones con elevados índices de sobrevivencia y desarrollo dependerá de la utilización de prácticas culturales que incluyan tecnologías biológicas, entre ellas la inoculación con hongos micorrícicos de alto potencial simbiótico.

Los objetivos del presente trabajo fueron: obtener una colección de hongos ectomicorrícicos de *Eucalyptus* a partir de muestras de hongos colectados en bosques de pino y eucalipto de diferentes zonas del país y de especímenes cedidos por centros de colección internacional, evaluar sus características de cultivo y la velocidad de crecimiento en diferentes medios y verificar su capacidad simbiótica en plántulas de *Eucalyptus grandis* obtenidas a partir de semillas y por micropropagación.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de hongos ectomicorrícicos

Recolección Los carpóforos se colectaron durante los meses de otoño (mayo-agosto) en montes de pino y eucalipto en distintas zonas del país, durante tres años consecutivos (1991-1993). Para los aislamientos se recogieron ejemplares jóvenes en la proximidad de los árboles y los hongos más maduros se usaron para la identificación y se conservaron como referencia.

Las muestras se transportaron al laboratorio en bolsas de papel y se mantuvieron en heladera a 3-5°C hasta el aislamiento.

Aislamientos Se realizaron en cámara de flujo laminar según la técnica de Molina y Palmer (1982): los carpóforos libres de restos de suelo se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 4%. En el caso de los *Gasteromycetes* que presentan carpóforos globosos y cerrados se realizó un corte superficial con bisturí para exponer las hifas internas evitando contaminaciones desde la superficie. Pequeños trozos de micelio interno se sembraron en placas de Petri (3 trozos por placa) o en tubos con

medio inclinado (1 trozo por tubo) con diferentes medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento fueron: Melin-Norkans modificado (MNM) (Molina y Palmer, 1982), Sabouraud (S), Extracto de Malta (EM) y Czapek (C) (Manual de medios de cultivo Oxoid, 1972).

Los cultivos se incubaron a 28°C hasta crecimiento visible.

Una vez logrado el cultivo puro, los aislamientos se conservaron en medio sólido inclinado, en heladera.

Los carpóforos fueron identificados en el Depto. de Botánica de la Facultad de Ciencias.

Características del crecimiento de un aislamiento de *Pisolithus tinctorius* (ET₁)

En medios sólidos: Un inóculo constituido por un disco de agar de 5 mm con cultivo crecido, obtenido del borde de una colonia de dos semanas se colocó en el centro de una caja de Petri con medio MNM y S, con 10 repeticiones. Determinaciones:

* diámetro de la colonia (en cm) se evaluó durante dos meses y se calculó la velocidad del crecimiento en ambos medios por la derivada del ajuste a una recta que se expresó como el incremento del diámetro de la colonia (cm) por semana.

En medios líquidos: Frascos de 200 ml con 50 ml de medio líquido (MNM o S) se inocularon con 3 discos de 5mm de diámetro del borde de colonias de dos semanas del hongo desarrollado en el correspondiente medio sólido, con 3 repeticiones.

Los cultivos se mantuvieron a 28°C con agitación diaria manual por 30 segundos y cada 4 días durante 40 días se recogió el micelio en filtros de papel Whatman N° 1 y se determinó el peso seco de los mismos a 65°C hasta peso constante.

Se midió el pH del filtrado con pHmetro.

La velocidad de crecimiento expresada como mg micelio seco/día se calculó por la derivada del ajuste a una recta de los datos.

Síntesis *in vitro* de la micorriza

Los aislamientos locales ET₁, Pt₆, Pt₂₄, Pt₁₆, Pt₁₇, Pt₁₉, Pt₂₁, Pt₂₂, Pt₂₄, cuyas procedencias figuran el el cuadro 1 y los aislamientos de *P. tinctorius* PF, PT₁₈₅, del BSSFT de Nogent sur Marne (Francia) y de USA (cedido por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) se utilizaron para verificar su capacidad micorrízica al inocularlos en:

Plántulas a partir de semillas: desinfectadas superficialmente con NaOCl al 4% por 10 minutos, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y germinadas asépticamente en cajas de Petri con papel de filtro, en la oscuridad. Se

transplantaron cuando alcanzaron 1-2 pares de hojas verdaderas a tubos de ensayo (3 cm X 20 cm) con 10 ml de medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g/l de sacarosa y distintos soportes sólidos: como turba/vermiculita 3:1 (v/v), vermiculita sola y papel de filtro. Los dispositivos se esterilizaron a 121°C por 20 minutos.

La inoculación se efectuó con discos de unos 5 mm de agar crecido (2 semanas) con los hongos en estudio (5 repeticiones por tratamiento) y se incluyeron controles sin inocular.

Los plántines se mantuvieron en solarío con fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad a 26 °C hasta la visualización macro y microscópica de las ectomicorrizas.

Plántulas micropropagadas: segmentos nodales y apicales de plántulas de aproximadamente 1 año del clon ALP 17, luego de 3-4 repiques en medio de multiplicación se transfirieron a medio de elongación. Luego de 20-25 días, aquellos explantos que alcanzaron un tamaño mayor a 1,5-2 cm se colocaron en medio de enraizamiento (sales minerales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) diluidas a la mitad con sacarosa 30 g/l, agar 8g/l y AIB 2,5 mg/l).

La inoculación se realizó con 4 discos de agar crecido con el hongo de 2 mm de diámetro aproximadamente, colocados 2 en la superficie del medio y 2 dentro del mismo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de hongos a partir de carpóforos

Se logró el aislamiento de hongos ectomicorrízicos a partir de carpóforos de bosques de pino y eucalipto de diferentes zonas del país, a partir de aproximadamente 100 especímenes (15 a 20 aislamientos por carpóforo, dependiendo del tamaño del mismo). El éxito de los aislamientos varió según la especie y el tipo de carpóforo. Las especies de *Gasteromycetes* que presentan carpóforos globosos y cerrados como los de *Pisolithus* y *Scleroderma* resultaron de fácil cultivo, en parte debido al menor grado de contaminación en relación a aquellos hongos con carpóforos de sombrero (*Agaricales*) en los cuales la manipulación puede introducir microorganismos contaminantes.

En el cuadro 1 se presentan los hongos obtenidos en cultivo puro a partir de aislamientos locales. Un 64% de los mismos correspondieron a cepas de *Pisolithus tinctorius*, 27% a *Scleroderma* spp. y el resto estuvo representado por *Boletus* spp. y *Amanita muscaria*. Se obtuvieron mejores resultados en los aislamientos en los medios Sabouraud (S) o Extracto de Malta (EM) en relación al clásico MNM, sin diferencias notorias entre los dos primeros. Ninguna de las especies colectadas creció bien en medio de Czapek.

Se concluye que los hongos ectomicorrízicos con los cuales se trabajó se desarrollan bien en los dos de los medios recomendados para hongos (S y MNM).

Cuadro 1 Hongos nativos aislados a partir de carpóforos

NOMENCLATURA	ESPECIE FUNGICA	ESPECIE ARBOREA	LUGAR
ET ₁	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₁	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	Tacuarembó
S ₅	<i>Scleroderma</i> sp.	Eucalipto	Tacuarembó
S ₆	<i>Scleroderma</i> sp.	Eucalipto	Tacuarembó
S ₇	<i>Scleroderma</i> sp.	Eucalipto	Tacuarembó
Pt ₃	<i>P. tinctorius</i>	Pino	Maldonado
S ₁₅	<i>Scleroderma</i> sp.	Pino	Soriano
Pt ₆	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	Canelones
Pt ₁₀	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₁₆	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
A ₃	<i>Scleroderma</i> sp.	Pino	Arazatí
A ₄	<i>Scleroderma</i> sp.	Pino	Arazatí
Pt ₁₇	<i>P. tinctorius</i>	Pino	Maldonado
Pt ₁₈	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₁₉	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
B _{M2}	<i>Boletus</i> sp.	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₂₀	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Am ₁	<i>Amanita muscaria</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₂₁	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₂₂	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₂₃	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres
Pt ₂₄	<i>P. tinctorius</i>	Eucalipto	T. y Tres

Crecimiento de un aislamiento local (ET1) en medios de cultivo líquidos y sólidos

Medios sólidos: La figura 1 presenta los resultados en la evaluación del crecimiento de este aislamiento en medios S y MNM sólidos. La velocidad de crecimiento expresada como variación en el diámetro de la colonia en el tiempo (cm/ semana) se mantuvo constante hasta la 4ª semana y muy similar en ambos medios (1,503 y 1,610 cm/semana en S y MNM, respectivamente). La ecuación de ajuste a una recta fue:

$$Y (\text{MNM}) = 0,375 + 1,503X$$

$$Y (S) = -0,205 + 1,618 X$$

Luego de este período el crecimiento comenzó a disminuir como consecuencia del agotamiento de nutrientes y/o la acumulación de productos tóxicos, por lo cual resulta aconsejable emplear cultivos de menor edad en los ensayos de inoculación.

El aspecto de las colonias en ambos medios fue diferente: en S el crecimiento fue más abundante y denso que en MNM y el medio se oscureció debido a la liberación de pigmentos y/o compuestos fenólicos por parte del hongo.

Medios líquidos: La figura 2 presenta los resultados en la variación del peso seco del micelio fúngico en el tiempo, en los dos medios en estudio, así como los cambios de pH experimentados, figura 3. El crecimiento en medio líquido del aislamiento ET₁ modificó el pH del medio MNM de 6.0 a 1.8 mientras que el peso seco del micelio varió de 1,2

a 12,6 mg. En S el pH varió de 5.3 a 4.0 y el peso seco de 55 a 28,3mg en 27 días.

El crecimiento fue mayor durante todo el período de la experiencia en medio S, luego de 20 días de incubación comenzó la fase estacionaria en MNM, mientras que en el medio S ésta no se alcanzó al finalizar la experiencia (1 mes), evidenciando mayor capacidad tampón. La acidificación muy marcada del MNM pudo haber causado la detención del crecimiento. La acumulación de micelio seco fue de 10,48 mg/día y de 5,18 mg/día en medios S y MNM, respectivamente.

Las rectas que reflejan el crecimiento de este aislamiento en diferentes medios de cultivo fueron:

$$Y = 0,013 + 0,0083 X (S)$$

$$Y = 0,0021 + 0,055 X (\text{MNM})$$

El aislamiento local de *P. tinctorius* en estudio presentó mejor crecimiento en medio Sabouraud tanto líquido como sólido. Los medios más adecuados para el aislamiento fueron S y EM, mientras que el MNM permitió un buen mantenimiento de los cultivos.

Síntesis *in vitro* de la micorriza

Plántulas a partir de semilla: el soporte de turba/vermiculita no permitió un buen desarrollo del micelio fúngico, que no logró invadir la zona radical a pesar del buen desarrollo de las plántulas. Se usó entonces vermiculita sola y/o papel de filtro como soportes, los que resultaron apropiados para la síntesis micorrízica. El uso de vermiculita

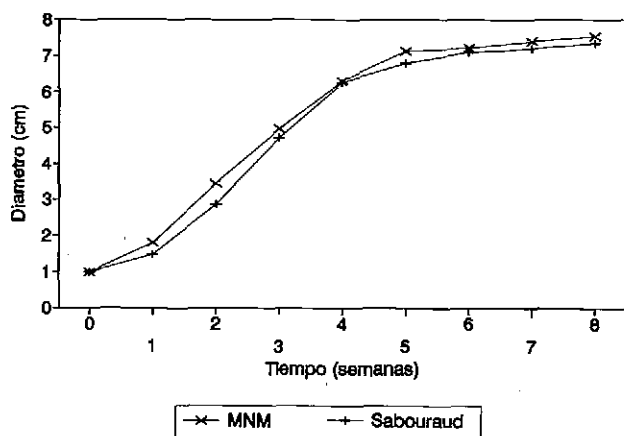


Figura 1. Crecimiento de *Pisolithus tinctorius* en medios sólidos.

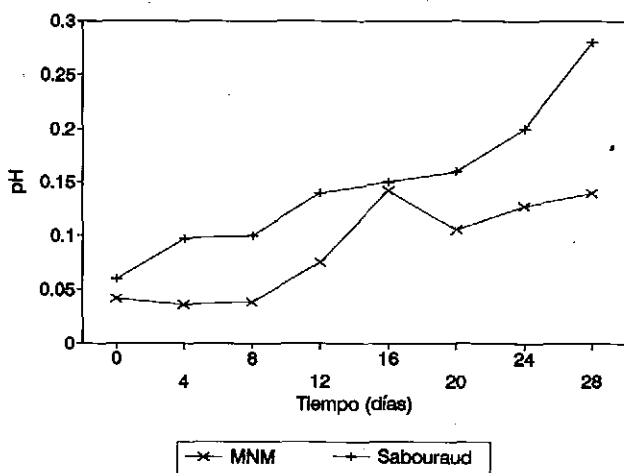


Figura 2. Evolución del peso seco del micelio en medio líquido.

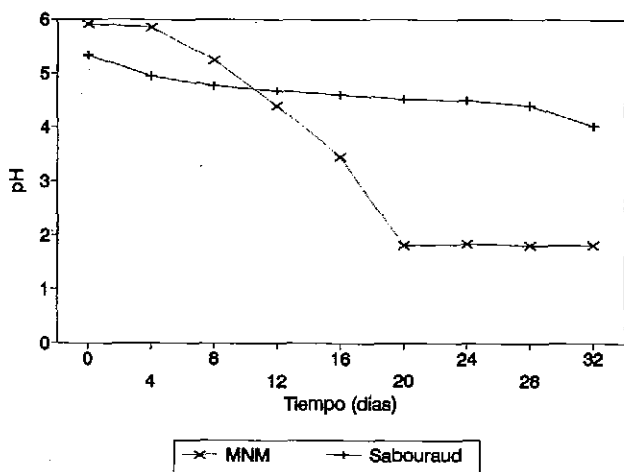


Figura 3. Variación del pH del medio.

presentó el inconveniente de que la misma queda adherida a las raíces lo que dificulta la observación. El papel de filtro presentó la ventaja adicional de permitir la visualización directa de las micorrizas a través del tubo y se facilitó la renovación del medio nutritivo. Este procedimiento permitió seguir visualmente la evolución del proceso sin destrucción de la muestra y puede ser usado en las primeras etapas de la selección de hongos.

El promedio de micorrización en las cepas testadas (excepto PF) varió desde 25% (Pt 17) hasta 75-80% (Pt19, Et₁). En el caso de hongo PF el crecimiento fue bueno pero no logró micorrizar. Los bajos porcentajes de micorrización para Pt₁₇ pueden ser debidos a problemas de especificidad ya que el hongo fue aislado de montes de pino. (de Oliveira, comp. pers.).

Plantines micropropagados: en la inoculación de segmentos nodales en el repique al medio de enraizamiento, se observó abundante crecimiento superficial del hongo que inhibió el desarrollo y la rizogénesis de los explantos. El micelio no se desarrolló en el interior del medio de cultivo, debido posiblemente a la falta de oxígeno. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Poissonier (1986, 1990) y Malajczuk (1986). No se logró ectomicorrización con ninguno de los hongos ensayados. Los estudios continúan inoculando las plántulas en la etapa de adaptación al suelo (transplante).

Se ajustó la metodología que permite realizar una rápida selección de hongos ectomicorrizales descartando especies no simbióticas en condiciones asépticas a partir de plántulas derivadas de semillas.

BIBLIOGRAFIA

- ARRUDA, L. e KRUGNER, T. L. 1988. Desenvolvimento ectomicorrízico em mudas de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* inoculadas com *Pisolithus tinctorius* em um viveiro comercial. *IPEF* 40:21-25.
- AZCON, G. DE AGUILAR y BAREA, J. 1988. Micorrizas en biología vegetal. Prensa Científica, Barcelona. 83-91
- HONRUBIA, M.; TORRES, P.; DIAZ, G. y CANO, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Publicaciones del Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza. Madrid. España. 44 pp.
- MAJOR, G., KRAUSE, M. y BARRIOS, J. 1993. Propagación clonal de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden por cultivo de tejidos. II simposio Argentino de Biotecnología Agropecuaria. REDBIO. Córdoba, Argentina.
- MALAJCZUK, N. y HARTNEY, V. J. 1986. Procedure for inoculation of micropropagated plantlets of *Eucalyptus camaldulensis* with ectomycorrhizal fungi, and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/vermiculite carrier. *Aust.For.Res.* 16:199-206.

- MARX, D.H. and KENNEY, D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungi inoculum. In: Schenck, N.C. (Ed.) *Methods and principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp. 131-146.
- MIKOLA, P. 1973. Applications of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. En Marks, G.C. y Kozłowski, T.T. (Eds) *Ectomycorrhizae their ecology and physiology*. pp 383-411. Academic Press.
- MOLINA, R.J. and PALMER, J.G. 1982 Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenck, N.C. (Ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp. 115-129.
- MOSER, M. and HASELWANDTER, K. 1983. Ecophysiology of mycorrhizal symbiosis. In: Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Zeigler, H. (Eds.) *Physiological plant ecology*. Encycl. Plant Physiol. N. Series, Berlín. pp. 391-421.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, T. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- OXOID, 1972. The Oxoid Manual of culture media. Ingredients and others laboratory services. Third ed. Oxoid Lt. Londres.
- POISSONNIER, M. 1986. Mycorrhization "in vitro" de clones d'eucalyptus. *AFOCEL, Ann. Rech Sylvicoles* 81-93.
- POISSONNIER, M. 1990. Étude expérimentale de la micorhization *in vitro* de clones d'eucalyptus. *AFOCEL, Ann. Rech Sylvicoles* 59-90.
- TRAPPE, J.M. and FOGEL, R.D. 1977. Ecosystematic functions of mycorrhizae. *USDA, Forest Service Research Note* 26:205-214.