

ACTA BOTANICA CUBANA



No. 119

20 de diciembre de 1998



INSTITUTO DE ECOLOGÍA Y SISTEMÁTICA

Influencia de la calidad del inóculo micorrizógeno sobre el crecimiento de plántulas de pinos*

Margarita RUÍZ, Sara HERRERA, Hugo IGLESIAS, Jorge L. ORTIZ y Teresa CABRERA**

ABSTRACT: The advantages of the spores utilization of *Pisolithus tinctorius* as effective inoculum in the growth and development of *Pinus caribaea* are discussed. A comparison between the traditional inoculation method used in nurseries in Cuba, and the utilization of spores and vegetative micelium of these mycorrhizal fungi was accomplished, being obtained the better results for spores as inoculum. Besides, it was demonstrated that, to inoculation effects, the spores should have not more than 2 years of storage, if optimal results are to be obtained in nursery production.

KEY WORDS: Ectomicorrizas, inoculum, vegetative micelium, spores, *Pisolithus tinctorius*, *Pinus caribaea*.

INTRODUCCIÓN

Se conoce que el éxito para la siembra de pinos a nivel mundial se debe a la inoculación de hongos ectomicorrizógenos. Estos hongos son capaces de entrar en simbiosis con las raíces de dichas especies forestales (Delwaulle *et al.*, 1982), para garantizar una mejor sobrevivencia y adaptación de las plántulas en el campo. En Cuba, la inoculación tradicional que se realiza en los viveros forestales es mediante la utilización de la capa superficial del suelo de pinares naturales mezclado con suelo natural. Este método trae aparejado diversas desventajas, pues no existe la seguridad de que el suelo utilizado contenga los hongos más deseables para la especie forestal en producción, además de que se necesitan grandes volúmenes para realizar la inoculación.

Por otra parte, se ocasiona el deterioro de los pinares naturales, así como el traslado de microorganismos perjudiciales y de malas hierbas. Muchos autores han podido demostrar que el micelio vegetativo de algunas especies de hongos ectomicorrizógenos (entre ellos, el más usado *Pisolithus tinctorius*), es considerado la mejor forma de inoculación (Alvarez y Trappe, 1983, Danielson *et al.*, 1984; Hendrix *et al.*, 1985; Valdés, 1989). Sin embargo, la inoculación con esporas es un método con gran potencial para desarrollar en el futuro; es práctico, económico y útil en países que carecen de la infraestructura necesaria para la producción de micelio vegetativo a gran escala. Este tipo de inóculo es aplicable a hongos capaces de producirlos en grandes cantidades como es el caso de *Pisolithus tinctorius*, el cual abunda en nuestro país. El incremento de la producción natural de esporocarpos de *Pisolithus* coincide con los meses de mayor precipitación, época que sería favorable para la colección de estos hongos, secado y almacenamiento en refrigeración hasta su utilización en la temporada de siembra.

*Manuscrito aprobado el 12 de marzo de 1998.

**Instituto de Ecología y Sistemática, Apartado 8029, C.P. 10800. La Habana, Cuba.

Sin embargo, no todos los años las condiciones climáticas son favorables y la producción de esporocarpos es, en ocasiones errática, por lo que resulta de interés conocer qué tiempo las esporas resisten las condiciones de almacenamiento manteniéndose viables y capaces de formar ectomicorrizas. Todo parece indicar que el mejor método para determinar la viabilidad de las mismas es mediante pruebas de síntesis de micorrizas.

En el presente trabajo, se probaron diferentes formas de inoculación de hongos ectomicorrizógenos a plántulas de *Pinus caribaea*, utilizando micelio vegetativo y esporas de *Pisolithus tinctorius* y se compararon los resultados con los obtenidos al inocular las plantas según el método tradicional (con suelo micorrizado).

Colateralmente, se realizó un trabajo de inoculación de esporas de diferentes tiempos de almacenamiento a plántulas de *Pinus caribaea* para conocer su viabilidad, con vistas a la recomendación de su utilización en planes de futura reforestación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento de inoculación de micelio vegetativo, esporas y suelo micorrizado: Se realizó un experimento en vivero de inoculación de micelio vegetativo de *Pisolithus tinctorius*, esporas del mismo hongo colectadas en dos localidades diferentes y suelo micorrizado (según el método tradicional) a plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*.

Se llenaron bolsas de polietileno de 850 g con una mezcla de suelo natural, suelo micorrizado y materia orgánica (3:2:1 V/V) según las proporciones recomendadas en las normas técnicas. Las bolsas se esterilizaron con bromuro de metilo (2% de cloropicrina) y luego de dos días de exposición al gas, se destaparon y dejaron aerear durante tres días antes de proceder a la siembra e inoculación.

Se utilizaron semillas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* de procedencia Cajálbana, las que recibieron un tratamiento pregerminativo según normas técnicas.

Se sembraron cinco semillas por bolsa las que fueron inoculadas en el momento de la siembra. Los tratamientos de inoculación aplicados aparecen reflejados en la Tabla 1. El experimento se fertilizó según la metodología utilizada en los viveros de producción de pinos.

Se realizó un diseño completamente aleatorizado, con 6 réplicas de 5 bolsas cada una por tratamiento de inoculación.

Las variables que se analizaron para la evaluación del crecimiento de las plantas fueron: diámetro del cuello de la raíz, altura, peso seco foliar y radical y porcentaje de micorrización según Ruiz *et al.* (1994).

Las diferencias entre los correspondientes tratamientos se analizaron mediante comparaciones realizando pruebas de contraste, utilizando el paquete de programas SYSTAT.

Comprobación de la viabilidad de las esporas de *Pisolithus tinctorius* según diferentes tiempos de almacenamiento: Se realizó un experimento de inoculación de esporas de *Pisolithus tinctorius* con diferentes tiempos de almacenamiento a plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*.

Las esporas habían sido colectadas en la localidad de Mayarí y en el momento de realizado el trabajo tenían 2 meses, así como 1, 2 y 4 años de almacenadas en refrigeración.

El experimento se realizó en casa de vegetación, utilizando macetas de 1 kg de volumen, que habían sido llenadas con una mezcla de suelo, zeolita y cachaza (50:25:25) previamente esterilizada en autoclave durante una hora tres días consecutivos.

Las semillas de pino recibieron tratamiento pregerminativo según normas técnicas, germinaron en vermiculita y fueron transplantadas al mes de sembradas. Para la inoculación, se añadieron a cada maceta 0.02 g de esporas mezcladas con vermiculita estéril y las macetas se cubrieron con aserrín esterilizado.

Las plantas fueron fertilizadas con 15 ml de solución Long Ashton semanalmente durante seis meses y medio, tiempo en el cual se desmontó el experimento para la evaluación de las variables de crecimiento (diámetro del cuello de la raíz, altura, peso seco foliar y radical, porcentaje de micorrización) según Ruiz *et al.* (1994).

Se analizaron 5 réplicas por tratamiento y se realizó un diseño completamente aleatorizado, los datos se procesaron mediante un ANOVA de clasificación simple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inoculación de micelio vegetativo. esporas y suelo micorrizado a plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*: Los resultados de biomasa obtenidos de la inoculación de micelio vegetativo, esporas y suelo micorrizado así como los porcentajes de micorrización se presentan en la Tabla 2.

Al comparar los datos de la inoculación tradicional con los de la inoculación de micelio vegetativo (2 vs 1), se observa que, aunque no significativos, los valores de biomasa fueron siempre superiores en el caso de la utilización de micelio, en este caso, el porcentaje de micorrización fue altamente significativo.

La comparación entre el método tradicional y la inoculación de esporas en suelo estéril (2 vs 4+6) mostró diferencias significativas para todas las variables analizadas, a favor de la inoculación de esporas; en el caso de la altura, peso seco de la raíz y porcentaje de micorrización, los valores fueron altamente significativos.

Los resultados entre el método tradicional y la inoculación de esporas en suelo no estéril con micorriza natural (2 vs 5 + 7), mostraron diferencias significativas para todas las variables analizadas, obteniéndose los mayores valores al inocular esporas. El porcentaje de micorrización fue también significativamente superior al inocular con esporas.

Al comparar las inoculaciones con micelio vegetativo o con esporas de *Pisolithus tinctorius* (1vs 4 + 6), se obtuvieron diferencias significativas para la altura, siendo los mejores resultados los obtenidos al inocular esporas.

El peso seco de la raíz y del tallo, aunque no estadísticamente diferentes, fueron menores en el caso de la inoculación de micelio vegetativo. Tampoco se observaron diferencias significativas en el diámetro del cuello de la raíz y porcentaje de micorrización

Aunque en la literatura se plantea que la utilización de micelio vegetativo resulta la mejor forma de inoculación (Marx y Barrett, 1974, Marx y Bryan, 1975, Marx *et al.*, 1976, 1977 y Marx *et al.*, 1978), en el trabajo se obtuvieron los mejores resultados al utilizar esporas de hongos ectomicorrizógenos, lo que ocasiono incrementos en la biomasa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ivory y Munga (1983) y Delwaulle *et al.* (1987), los que encontraron que la inoculación de esporas de hongos ectomicorrizógenos fue incluso mejor que la inoculación realizada con el micelio vegetativo de dichos hongos. Otras investigaciones también hablan a favor del uso de esporas (Castellano, 1987; Cordell *et al.*, 1987; Marx y Cordell, 1988; Martínez-Amores *et al.*, 1991; Torres y Honrubia, 1994; Parladé *et al.*, 1996).

La comparación de los datos obtenidos al inocular esporas de dos localidades diferentes (4 + 5 vs 6 + 7) muestra diferencias significativas para la altura. En este caso, en el diámetro del cuello de la raíz, aunque no se observaron diferencias estadísticas, los valores de P tendieron a la significación (cerca de 0.05). Los mejores resultados se correspondieron con la inoculación de las esporas de Mayarí. Estos resultados nos indican la necesidad de estudiar las características del suelo donde se vaya a aplicar el inóculo, así como las características del suelo de donde este proviene para poder inferir éxitos en la simbiosis.

Las condiciones del suelo de la localidad de Mayarí son muy oligotróficas, la relación Ca/Mg es menor que uno. Al predominar el magnesio (el suelo es serpentinoso), el fósforo disponible es casi nulo. Por otra parte, el pH en KCl es más alto que en H₂O porque el cambio catiónico es muy bajo. Debido a todo esto, se crean condiciones en el suelo que unido a las características ecológicas del territorio hace que se produzca una diversificación de las especies y facilita el establecimiento de especies endémicas (Borhidi, 1991). Las especies que allí habitan son muy evolucionadas para resistir las condiciones de estrés a que están sometidas por lo que consideramos que estas mismas condiciones ocasionaron que las esporas de Mayarí fueron más competentes que las de Viñales.

Al inocular esporas en suelo estéril y en suelo micorrizado sin esterilizar (4 + 6 vs 5 + 7), no se obtuvieron diferencias significativas para ninguna variable analizada. Estos resultados pudieran ser de interés, pues en los viveros de producción no se esteriliza el suelo para la inoculación. El hecho de que la inoculación con esporas diera los mismos resultados independientemente de si el suelo estuviera esterilizado o no, evidencia que los hongos micorrizógenos nativos presentes en el suelo no estéril eran de baja eficiencia simbiótica o contaban con pocos propágulos capacitados para colonizar.

La utilización de cualquiera de las variantes de inoculación (3 vs 1 + 2 + 4 + 6) produjo aumentos significativos en todas las variables analizadas en comparación con el suelo estéril. El porcentaje de micorrización resultó significativamente mayor en el caso de los tratamientos inoculados. Se conoce que estas plantas dependen para su sobrevivencia de las ectomicorrizas. Los datos obtenidos confirman este criterio, pues las plantas sin inocular (tratamiento 3), presentaron los valores más bajos en las variables analizadas.

El porcentaje de micorrización alcanzado por las plantas sin inocular (de seguro obtenido por contaminación durante el experimento), no garantiza la sobrevivencia al trasplante, pues se conoce

que para que los efectos beneficiosos de la inoculación sean patentes, el sistema radicular debe tener al menos 50% de sus raíces micorrizadas (Marx y Cordell, 1988). El hecho de que las plántulas alcancen 12,5 cm de altura, no debe ser un requisito indispensable para el transplante del vivero al campo (según normas técnicas que por lo demás, no están publicadas). Lo que sí debe ser considerado como indispensable es la posibilidad de realizar una evaluación del sistema radicular que compruebe la presencia de una cantidad adecuada de micorrizas, y por tanto, de una buena sobrevivencia en el campo, pues en el presente experimento, las plántulas pertenecientes al control estéril alcanzaron una altura superior a la mencionada anteriormente, y sin embargo, con menos del 33% de micorrización.

De manera general, los resultados de la inoculación de hongos ectomicorrizógenos a plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* fueron siempre superiores que en el caso de la utilización del control estéril.

El método de inoculación tradicional resultó de todos, el menos eficiente, pues los parámetros de biomasa medidos así como el porcentaje de micorrización fueron mayores con la inoculación de micelio vegetativo y de esporas de *Pisolithus tinctorius*. Los mejores resultados se obtuvieron al inocular esporas a las plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*; la inoculación de micelio vegetativo también resultó satisfactoria.

Marx y Kenney (1982) encontraron que las esporas de estos hongos necesitan por lo menos dos meses después de la germinación de la semilla para formar ectomicorrizas macroscópicamente detectables y cuatro meses para estimular el crecimiento de las plántulas de *Pinus taeda*. La mayor desventaja de la inoculación con esporas consiste en el tiempo que demora el desarrollo de la simbiosis, el cual es mucho más lento que cuando se inocular micelio vegetativo, y permite la colonización por otros hongos ectomicorrizógenos o patógenos no deseables y reducir la infectividad del inóculo. Pensamos que los mejores resultados obtenidos por nosotros en el caso de la inoculación con esporas responden, en gran medida, a la temperatura de los suelos. Muchos autores han demostrado la sobrevivencia del micelio de *Pisolithus tinctorius* a temperaturas de hasta 42°C (Marx *et al.*, 1970; Mamoh y Gbadegesin, 1980; Hung y Chien, 1978) en condiciones de laboratorio.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el caso de la inoculación de micelio vegetativo coinciden generalmente con trabajos realizados en regiones con climas no tropicales (Marx *et al.*, 1984; Pera *et al.*, 1994). Sin embargo, en investigaciones realizadas en nuestro país comparando la inoculación de esporas y micelio vegetativo (Ferrer *et al.*, 1990), los mejores resultados en el porcentaje de micorrización se obtuvieron al inocular esporas, las que son mucho más resistentes a los cambios de las condiciones climáticas.

La utilización de micelio vegetativo tiene ventajas sobre la utilización de suelo micorrizado, pues, como se plantea con anterioridad, se introduce el hongo deseado según la planta que se vaya a sembrar, elimina los parásitos y la micorrización es mucho más rápida.

Si la respuesta a la inoculación con esporas fue similar o mayor que la de micelio vegetativo, entonces podría pensarse en sustituir el método de inoculación tradicional que actualmente se realiza en nuestro país con el empleo de las esporas de los hongos más deseables.

Esto traería como ventajas, por una parte, mejores resultados en la micorrización, el ahorro de grandes insumos, pues se evitaría el traslado del suelo micorrizado de los pinares naturales hacia los viveros de producción y desde el punto de vista conservacionista, la protección de los pinares naturales. Este tipo de inóculo es aplicable a hongos capaces de producirlas en grandes cantidades, como *Pisolithus tinctorius*, el cual abunda en nuestro país.

El incremento de la producción natural de *Pisolithus* se ha observado que coincide con los meses de mayor precipitación, época que sería favorable para la colección de estos hongos, secado y almacenamiento en refrigeración hasta su utilización en la temporada de siembra. Sin embargo, no todos los años las condiciones climáticas son favorables y la producción de esporocarpos, es, en ocasiones, errática, por lo que resulta de interés conocer qué tiempo las esporas resisten las condiciones de almacenamiento manteniéndose viables y capaces de formar ectomicorrizas.

Resultados de la inoculación de esporas de *Pisolithus tinctorius* con diferentes tiempos de almacenamiento: La altura y peso seco del tallo y la raíz alcanzadas por las plantas mostraron un buen desarrollo de las mismas para el tiempo de duración del experimento (Tabla 3).

No se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas al utilizar esporas de diferentes edades.

El porcentaje de micorrización, aunque no fue estadísticamente diferente, fue menor en el caso de las esporas más viejas y aún así el resultado obtenido se aproxima al 50%, valor recomendado en la micorrización de los pinos, según Marx y Cordell (1988)

Se plantea que la utilización de esporas es una variante satisfactoria para los países que carecen de la infraestructura necesaria para la producción de micelio vegetativo, aunque hasta el momento no existen pruebas para demostrar el tiempo en que las mismas permanecen viables. todo parece indicar que lo más acertado es la realización de pruebas de síntesis de ectomicorrizas.

En el experimento se obtuvo que resulta lo mismo utilizar esporas de 2 meses, que de uno, dos o cuatro años de almacenamiento en lo que respecta a la formación de biomasa vegetal.

CONCLUSIONES

- Las cepas y esporas provenientes de los lugares más perturbados (Mayarí), resultaron más eficientes en la formación de ectomicorrizas en *Pinus caribaea* var. *caribaea*.
- La inoculación de esporas de *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* es efectiva y permite estabilizar tecnológicamente los resultados esperados.
- Se puede sustituir el método tradicional de suelo micorrizado por la inoculación de esporas de *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *Pinus caribaea*.
- Las esporas de *Pisolithus tinctorius* almacenadas hasta cuatro años no pierden su viabilidad.

RECOMENDACIONES

Debe sustituirse el método de inoculación tradicional de los viveros forestales de pinos por la inoculación de esporas de hongos formadores de ectomicorrizas sobre suelo no esterilizado por ser más eficiente, contribuir a preservar los bosques naturales y constituir un ahorro considerable de divisas.

2. Estudiar la dinámica de producción de esporocarpos de distintas especies de hongos ectomicorrizógenos en plantaciones de pinos, para garantizar la utilización de estas esporas como fuente alternativa de inóculos.

3. Las esporas deben tener como máximo cuatro años de almacenadas en refrigeración, para lograr que las plántulas tengan una micorrización cercana al 50%. Con el almacenamiento de las mismas, no sólo se garantizaría la inoculación en los lugares donde su producción haya sido errática, sino que también podría pensarse en su fácil traslado hacia lugares con planes de futura reforestación.

REFERENCIAS

- Alvarez, E. and J. M. Trappé, 1983: Dusting roots of *Abies concolor* and other conifer with *Pisolithus tinctorius* spores at outplanting time proves ineffective. *Can. J. For. Res.* Vol. 13, No. 5, pp. 1021- 1023.
- Borhidi, A. 1991: Phytogeography and vegetation ecology of Cuba. Akadémiai Kiadó, Budapest, 877p.
- Castellano, M.A. 1987: Ectomycorrhizal inoculum production and utilization in the Pacific Northwestern U.S.: a glimpse a the past, a look to the future. In *Mycorrhizae in the Next Decade Practical Applications and Research Priorities. Seventh North American Conference on Mycorrhizae*, May 3-8, 1987, Gainesville, FL. Edited by D.M.Sylvia, L.L Hung and J.H. Graham. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, Gainesville.
- Cordell, C.E.; D.H. Marx; S.B. Maul and J.H. Owen 1987: Production and utilization of ectomycorrhizal fungal inoculum in the eastern United States. In *Mycorrhizae in the Next Decade Practical Applications and Research Priorities. Seventh North American Conference on Mycorrhizae*, May 3-8, 1987, Gainesville, FL. Edited by D.M.Sylvia, L.L Hung and J.H. Graham. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, Gainesville.
- Danielson, R., M.; S. Visser and D. Parkinson, 1984: The effectiveness of micelial slurries of mycorrhizal fungi for the inoculation of container-grown jack pine seedlings. *Can. J. For. Res.* 14: 140-142.
- Delwaulle, J. C., J. Garbaye and G. Okombi, 1982: Stimulation de la croissance initiale de *Pinus caribaea* Morelet dans une plantation du Congo par contrôle de la mycorrhization. *Rev. Bois et Forest des tropiques*, 196: 25-32.
- Delwaulle, J.C.; D. Diangana and J. Garbaye 1987: Augmentation de la production du pin des caraibes dans la région cotière du Congo par introduction du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. *Biologie et foret*, pp. 409-417.

- Ferrer, A., M. Del Río, T. Cabrera, S. Herrera y A. Cárdenas 1990: Efecto de diferentes métodos de inoculación ectomicorrizógena sobre el crecimiento de posturas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Revista Centro Agrícola, 17(1): 82-95.
- Hendrix, J. W., C. S. Hunt and D. M. Maronex 1985: Relationship between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* associated with loblolly pine and acid-generating thiobacillus spp. on an acidic strip mine site. Can. J. of Microbiology, Vol. 31, No. 9, pp. 878-879.
- Hung, L.L. and C.Y. Chien 1978: Physiological studies on two ectomycorrhizal fungi: *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus*. Trans Mycol Soc Japan 19: 121-127.
- Ivory, M. H. and F. M. Munga 1983: Growth and survival of container-grown *Pinus caribaea* infected with various ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil. 71, 339-344.
- Martínez-Amores, E.; M. Valdés and M. Quintos 1991: Seedling growth and ectomycorrhizal colonization of *Pinus patula* and *Pinus radiata* inoculated with spores of *Helvella lacunosa*, *Russula brevipes* or *Lycoperdon perlatum*. New Forests 4, pp. 237-245.
- Marx, D.H. and J. P. Barrett 1974: Mycorrhizae and containerized forest tree seedlings. Reprinted from: Great plains Agricultural Council Publication 68 pp. 85-92
- Marx, D.H. and W.C. Bryan 1975: Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. For.Sci. 22: 245-254.
- Marx, D.H., W. C. Bryan and C. E. Cordell 1976: Growth and ectomycorrhizal development of pine seedlings in nursery soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. Forest Science, Vol. 22, No. 1, pp. 91-100.
- Marx, D.H., W.C. Bryan y C.E. Cordell 1977: Survival and growth of pine seedlings with *Pisolithus* ectomycorrhizae after two year on reforestation sites in North Carolina and Florida. Forest science, Vol. 23, No. 3, pp. 363-373.
- Marx, D.H. , W.C. Bryan y C.B. Davey 1970: Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae of *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. Forest Sci 16: 424-431.
- Marx, D.H. and C.E. Cordell 1988: Specific ectomycorrhizae improve reforestation and reclamation in the eastern United States. In Proceedings of the Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry, May 1-4, 1988, Centre de recherche en biologie forestière, Faculté de forestiere et de géodésie. Université Laval, Sainte-Foy (Québec). Edited by M. Lalonde and Y. Piché.
- Marx, D.H., C.E. Cordell, D. S. Kenney, J. G. Mexal, J.D. Artman, J. W. Riffle y R. J. Molina 1984: Commercial Vegetative Inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. Forest Science, Monograph 25, pp 1-101.
- Marx, D.H. y D.S. Kenney 1982: Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In Methods and principles of mycorrhizal research. Editado por N.C. Schenck. Amer. Phytopath Soc, St. Paul, Minnesota, 244 p.

- Marx, D.H., W. G. Morris y J. G. Mexal 1978: Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated and nonfumigated nursery soil infested with different fungal symbionts. Forest Sci., Vol. 24, No. 2, pp. 193-203.
- Normas Técnicas Ramales de la Agricultura "NRAG 325" 1978: Vivero Foerstal. Siembra en bolsas.
- Normas Técnicas Ramales de la Agricultura "NRAG 326" 1978: Atenciones culturales en la producción de posturas en bolsas.
- Parladé, J.; J. Pera y I.F. Alvarez 1996: Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 6, pp. 237-245.
- Pera, J.; J. Parlade y I.F. Alvarez 1994: Eficacia del tipo de inóculo de *Pisolithus tinctorius* en la formación de micorrizas en *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii*. Investigación agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Vol. 3(1), pp. 19-20.
- Ruiz, M.; R. Herrera; H. Iglesias y S. Herrera 1994: Evaluación de un nuevo método de conteo de ectomicorrizas. Ciencias Biológicas 27, pp 1-5.
- Torres, P. and M. Honrubia 1994: Inoculation of containerized *Pinus halapensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers.) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. Ann Sci For 51, pp. 521-528.
- Valdés, M. 1989: Técnicas de inoculación con propágulos ectomicorrízicos. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 31: 341-346.

Tabla 1. Diferentes tratamientos de inoculación de hongos ectomicorrizógenos (micelio vegetativo, esporas y suelo micorrizado) en plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea*

Tratamientos	Fuentes de inóculo	Procedencia	Modo de inoculación
1	cepa 872	Esporocarpo de <i>Pisolithus tinctorius</i> de la Estación Experimental de Viñales.	Micelio vegetativo cultivado en vermiculita - turba de musgo- MMN (Marx y Bryan, 1975).
2	Suelo micorrizado	Vivero Forestal Simón Bolívar.	Método tradicional de inoculación (5% de suelo micorrizado por bolsa).
3	Control Estéril	Vivero Forestal Simón Bolívar.	Mezcla de suelo natural, micorrizado y materia orgánica (3:2:1 V/V) esterilizada con bromuro de metilo.
4	Esporas <i>Pisolithus tinctorius</i> .	Estación Experimental de Viñales.	0,02 g de esporas por bolsa en bolsas estériles.
5	Esporas <i>Pisolithus tinctorius</i> .	Estación Experimental de Viñales.	0,02 g de esporas por bolsa en bolsas sin esterilizar.
6	Esporas <i>Pisolithus tinctorius</i> .	Estación Experimental de Mayarí.	0,02 g de esporas por bolsa en bolsas estériles.
7	Esporas <i>Pisolithus tinctorius</i> .	Estación Experimental de Mayarí.	0,02 g de esporas por bolsa en bolsas sin esterilizar.

Tabla 2. Medias y errores estándares de las diferentes variables analizadas en plántulas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* inoculadas con micelio vegetativo, esporas y suelo micorrizado. (n=6 réplicas; cada réplica representa la media de 5 plantas). Comparaciones y P>F

Tratamientos	Diámetro del cuello de la raíz (cm)		Altura (cm)		Peso Seco Tallo (g)		Peso Seco Raíz (g)		Micorrizac. (%)	
	X	SX	X	SX	X	SX	X	SX	X	SX
1	0.30	0.01	15.65	1.19	0.778	0.15	0.529	0.07	61.4	5.6
2	0.27	0.01	14.87	0.35	0.895	0.08	0.420	0.11	44.4	6.2
3	0.22	0.05	12.78	0.89	0.423	0.07	0.264	0.09	33.2	0.05
4	0.30	0.12	17.03	3.33	1.445	1.39	0.738	0.66	57.4	16.9
5	0.26	0.03	14.35	1.72	0.759	0.14	0.479	0.20	60.6	2.93
6	0.37	0.07	18.6	2.7	1.652	0.91	0.823	0.42	63.9	2.75
7	0.33	0.03	19.53	0.93	1.389	0.26	0.676	0.15	65.1	2.99
Comparaciones										
3 vs 1+2+4+6	0.001		0.001		0.005		0.005		< 0.001	
2 vs 1	0.244		0.471		0.48		0.335		< 0.001	
2 vs 4+6	0.029		0.003		0.034		0.008		< 0.001	
2 vs 5+7	0.006		0.01		0.027		0.035		< 0.001	
1 vs 4+6	0.360		0.02		0.175		0.102		0.427	
4+5 vs 6+7	0.115		0.066		0.460		0.839		0.448	
4+6 vs 5+7	0.834		0.538		0.907		0.456		0.959	

Valores de P < 0.05 (significativos)

Tabla 3. Variables analizadas en plántulas de *Pinus caribaea* inoculadas con esporas de *Pisolithus tinctorius* de diferentes tiempos de almacenamiento. (r = 5 réplicas). P>0.05

Tiempo de almacenamiento de las esporas	Diámetro del cuello de la raíz (cm)	Altura (m)	Peso seco (g)		Micorrización (%)
			TALLO	RAÍZ	
4 años	0.26	23.92	1.19	0.53	48
2 años	0.22	23.64	1.01	0.56	63
1 año	0.25	22.8	1.08	0.52	63
2 meses	0.28	22.9	1.13	0.54	60