

EMPLEO DE LA ROCA ZEOLITA CUBANA COMO SUSTRATO SÓLIDO PARA LA REPRODUCCIÓN DEL HONGO ECTOMICORRIZÓGENO *PISOLITHUS TINCTORIUS*

ANAI RAD FERRE R GRAU,¹ GERARDO RODRÍGUEZ FUENTES,² EMELINA RENGIFO
CASTAÑEDA¹ Y ANA GONZÁLEZ-ABREU¹

¹ Instituto de Investigaciones Forestales (IIF). Calle 174 no. 1723
e/ 17B y 17C, Rpto. Siboney, Playa, La Habana, Cuba.

² Centro de Investigaciones Científicas (CENIC). Avenida 25
no. 5202 esq. a 158, Apartado 6880, Rpto. Cubanacán, Playa,
La Habana, Cuba.

RESUMEN

La introducción artificial de los hongos ectomicorrizógenos en los viveros forestales puede realizarse a través de la reproducción masiva de micelio vegetativo utilizando un sustrato sólido como perlita de expansión. Se estudió el crecimiento y desarrollo micelial de la especie fúngica Pisolithus tinctorius, y se empleó como soporte la roca zeolítica cubana, natural y modificada por intercambio iónico con amonio, potasio y calcio. Se obtuvo un incremento en la velocidad de crecimiento y en la densidad micelial de la especie micorrizógena soportada en la roca zeolítica.

ABSTRACT

The artificial introduction of ectomycorrhizal fungus in forestry nurseries, can be done by massive reproduction of vegetative micelium, using a solid sustrate like perlite of expansive. It was studied the growth and development micelial of the fungal species Pisolithus tinctorius, using as like support the cuban zeolitic rock: natural and modified by ionic exchange with ammonium, potassium and calcium. An increment was obtained in the growth rate and micelial density of the mycorrhizal species supported in the zeolitic rock.

INTRODUCCIÓN

La micorrización en 75% de las especies del reino vegetal posibilita un incremento en la supervivencia y desarrollo de las plantaciones, sobre todo en aquellos suelos marginales y degradados por la minería

[Gardner and Malajczuck, 1988; Malajczuk *et al.*, 1994].

En nuestro país la inoculación micorrizógena a las posturas de los pinos se realiza tradicionalmente mediante la mezcla de sustratos

naturales micorrizados, como es el caso del suelo de pinar, lo que trae como consecuencia la manipulación y traslado de grandes volúmenes de tierra, y provocar así el desequilibrio ecológico de los pinares establecidos, además de la introducción de semillas de plantas indeseables y microorganismos fitopatógenos existentes en el suelo, por lo que ambos resultan más perjudiciales para el crecimiento de las plantas que el propio beneficio derivado de los hongos micorrizógenos [Castellano y Molina, 1989].

Numerosas investigaciones han demostrado que el mejor método biológico para la introducción de hongos ectomicorrizógenos destinados a la micorrización de las raíces de las plantas de *Pinus* sp. en vivero es por medio de la inoculación con micelio vegetativo de cepas puras [Garbaye, 1988; Swart and Theron, 1990; Pera *et al.*, 1994]. Esta técnica de inoculación con micelio vegetativo evita los inconvenientes anteriormente mencionados cuando se utiliza el suelo de pinar. Para la obtención de cantidades suficientes de inóculo micelial es necesario la reproducción de fragmentos de micelio vegetativo sobre un sustrato sólido como vermiculita o perlita de expansión, que son soportes minerales del tipo aluminio-silicato y que aparecen en la naturaleza en forma de rocas de origen volcánico y sedimentario.

En Cuba hasta el momento no se han detectado yacimientos de vermiculita o perlita de expansión, pero sí de zeolitas, que son abundantes a lo largo de nuestra isla, y

que si bien no poseen la cualidad de expansión por la acción del agua, resultan buenos intercambiadores iónicos y poseen además la porosidad necesaria que requieren los soportes para la reproducción de estos hongos. Por esta razón el objetivo de nuestra investigación fue ensayar la posibilidad de emplear la roca zeolítica cubana, con vistas a su aplicación como sustrato para la reproducción y obtención de inóculo micelial, destinado a la micorrización de las posturas de *Pinus* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

La roca zeolítica cubana empleada fue la muestra ZP1-86 perteneciente al yacimiento de Piojillo, ubicado en la provincia de Villa Clara, en Cuba. Esta muestra posee un tamaño de partícula que varía entre 1 y 3 mm. Los tratamientos experimentales fueron roca zeolita en forma natural y modificada por intercambio iónico con los iones amonio, potasio y calcio, además del testigo, cuyo sustrato fue la perlita de expansión. Se analizaron 10 réplicas por cada tratamiento.

La perlita de expansión fue obtenida como producto de importación proveniente de la república de Checoslovaquia. El hongo ectomicorrizógeno estudiado fue *Pisolithus tinctorius* Pers. (Coker & Couch), por ser una de las especies que tienen una mayor distribución geográfica y de hospederos, como *Pinus* sp. y *Eucalyptus* spp. Se ha comprobado además que esta especie ectomicorrizógena tiene gran capacidad para crecer bajo diferentes condicio-

nes esdafoclimáticas y en medio de cultivo [Pera *et al.*, 1994].

Los hongos ectomicorrizógenos se propagan masivamente según la técnica descrita por Marx y Bryan (1975). En erlenmeyers de 2 L se introduce una mezcla del soporte sólido, turba y solución nutritiva del medio Mehlin Norkrans modificado con glucosa. En este estudio cada soporte (sustrato sólido) corresponde con un tratamiento, y en cada uno de ellos se le introdujo de forma aséptica y superficial cinco discos miceliales de 8 mm de diámetro de *P. tinctorius*, obtenidos de los aislamientos y crecimiento de esta especie en el mismo medio de cultivo sólido, sin la presencia del soporte y turba. Los cuerpos fructíferos de *P. tinctorius* fueron colectados en plantaciones de siete años de *Pinus cubensis*, establecidos en la provincia de Holguín.

También se realizaron observaciones quincenales durante noventa días con el objetivo de evaluar el crecimiento micelial de *P. tinctorius* soportado en cada uno de los sustratos sólidos. La estimación visual, por su parte, nos permitió cuantificar el porcentaje de micelio vegetativo por volumen (%) ocupado del erlenmeyer.

Complementariamente, al final del período evaluado se observaron muestras de micelio vegetativo soportado en perlita de expansión y zeolita natural por medio de la utilización del microscopio óptico y electrónico de barrido, para de esta forma comparar la densidad micelial y viabilidad (esporulación) de la cepa

estudiada. El microscopio electrónico de barrido fue JEM 100 x II con dispositivo de barrido ASID 4D.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Fig. 1* se observa la dinámica de crecimiento micelial de *Pisolithus tinctorius*, soportado en la zeolita natural y modificada con iones amonio, calcio y potasio. Como se puede apreciar, desde el inicio hasta el final del período evaluado en el experimento, el crecimiento fue más rápido en la zeolita natural y modificada que en la perlita de expansión.

Además, se observa cómo la velocidad de crecimiento micelial de *P. tinctorius* soportado en la zeolita natural y modificada con calcio fueron iguales entre sí e inferiores a las variantes de zeolita con amonio y potasio.

Por otro lado, se muestra que en los tratamientos con zeolita natural y modificada con calcio, el ciento por ciento del soporte sólido es cubierto con micelio fúngico a los sesenta días, y a los cuarenta y cinco con las otras dos variantes, es decir, con la zeolita modificada con amonio y potasio; sin embargo, con la perlita de expansión el máximo de crecimiento micelial se alcanza a los noventa días, por lo que en los demás tratamientos el crecimiento es mucho más rápido en un menor tiempo de incubación, situación muy importante para el manejo de inóculo y su aplicación en el sustrato de crecimiento para las posturas en vivero.

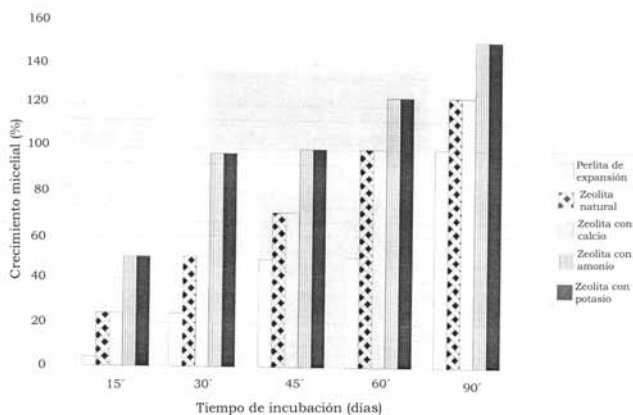


Fig. 1. Dinámica del crecimiento micelial de *Pisolithus tinctorius*

Cabe señalar que otros autores como Marx y Bryan (1970), Peña Puente (1979) y Ferrer *et al.* (1987) han desarrollado esta técnica de inoculación con *Pisolithus tinctorius* utilizando como soporte la perlita de expansión, y reportan como máximo crecimiento micelial, en cuanto a volumen ocupado de igual capacidad a la empleada en nuestro ensayo, un tiempo de noventa días.

Cuando se realizaron los análisis microscópicos de muestras obtenidas de fragmentos miceliales soportados en zeolita natural y perlita de expansión, se pudo comprobar que la densidad poblacional de la zeolita natural era mucho mayor que en la perlita de expansión, por lo que este resultado se corresponde positivamente a los acelerados crecimientos de este nuevo soporte estudiado respecto a la perlita de expansión. La observación al microscopio electrónico de barrido

permitió precisar que los micelios del hongo *Pisolithus tinctorius* se soportan en las partículas de zeolita natural al penetrar a través de sus poros secundarios, o sea, en los espacios intercristalinos, así como que los micelios se dispusieron entre los cristales de mordenita y clinoptinolipta. Igualmente pudo verificarse la viabilidad de la especie ectomicorrizógena, ya que se observaron esporas soportadas en la roca zeolítica y la perlita de expansión.

La estructura mineralógica de la zeolita posee canales (espacios libres) inter e intracristalinos donde se almacena gran cantidad de agua, gases y cationes, estos últimos susceptibles de ser intercambiados por otros cationes, lo que determina en gran medida las propiedades fisicoquímicas de estos minerales y, por lo tanto, sus consecuentes usos y aplicaciones en la esfera agrícola, forestal y acuícola [Wilson y

Mumpton, 1984; Mercadet, 1990; Herrero *et al.*, 1994].

Por otra parte, la penetración de los micelios soportados en la perlita de expansión, así como su distribución entre los grandes espacios entre sí, es posible que limite su función como suministrador o portador de nutrientes, a diferencia de la roca zeolítica que además actúa como soporte, cualidad que solo es atribuible a la perlita de expansión.

CONCLUSIONES

El empleo de la roca zeolítica cubana, natural y modificada por intercambio iónico con amonio, potasio y calcio, como sustrato sólido en el medio de cultivo para la obtención de inóculo micelial de *Pisolithus tinctorius*, supera a la perlita de expansión en cuanto a:

- Mayor obtención de biomasa micorrizógena en un período de tiempo mínimo de incubación (cuarenta y cinco días).
- Actúa como portador o suministrador de nutrientes al medio de cultivo para el crecimiento micelial de la especie ectomicorrizógena y, por tanto, para el incremento en la productividad y sobrevivencia de las especies vegetales.
- La estructura mineralógica permite la protección micelial contra las tensiones ambientales, mecánicas y microbianas presentes en el momento de inocular las plántulas en el vivero.
- Desde el punto de vista económico esta alternativa constituye un

ahorro de recursos financieros, sobre todo para aquellos países que como Cuba no poseen estos yacimientos (perlita de expansión o vermiculita), y que indiscutiblemente son utilizados para esta finalidad.

- Las velocidades de crecimiento micelial de *Pisolithus tinctorius* en un mismo período de incubación (días), soportadas en la roca zeolítica modificada con amonio y potasio, fueron mayores que cuando se utiliza como soporte esta roca natural o modificada con calcio.

BIBLIOGRAFÍA

- CASTELLANO, A.; R. MOLINA: «Mycorrhizae», The Container Tree Nursery Manual, USDA For. Service, Washington, D. C., Vol. 5. *Agric. Handbook* 674 : 101-167, 1989.
- FERRER, A.; T. CABRERA; S. HERRERA: «Perspectivas para la utilización de las micorrizas ectótrofas en el cultivo de *Pinus caribaea* var. *caribaea*», *Revista Forestal Baracoa* 17 (2):97-107, 1987.
- GARBAYE, J.: «Les plantations forestieres tropicales: un champ d'application privilegie pour la mycorrhization controles», *Bois et Forest des Tropiques* no. 216:1-17, 1988.
- GARDNER, J.; N. MALAJZUCK: «Recolonizations of rehabilitated bauxite mine sites in Western Australia by mycorrhizal fungi», *For. Ecol. Management* 24: 27-42, 1988.
- HERRERO, G.; A. GONZÁLEZ-ABREU; C. ROMERO: *Estudio de factibilidad económica y científico-técnica del resultado: utilización de la zeolita natural y modificada en la reforestación*, Monografía, Instituto de Investigaciones Forestales, La Habana, 1994.
- MALAJZUCK N.; P. REDELL; M. BRUNDRETT: «Role of Ectomycorrhizal Fungi in Minesite Reclamation», *American Phytopathological Soc.*: 83-103, 1994.
- MARX, D. H.; W. C. BRYAN: «Pure Culture Synthesis of Ectomycorrhizae by *Telephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on Different Conifer Host», *Can. J. Bot.* 48: 639-643, 1970.

- MARX, D. H.; W. C. BRYAN: «Growth and Ectomycorrhizal Development of Loblolly Pine Seedlings in Fumigated Soils Infested with the Fungal Symbiont *Pisolithus tinctorius*», *Forest Sci.* 21:245-254, 1975.
- MERCADET, A.; A. GONZÁLEZ-ABREU; J. A. MARTÍNEZ; P. ROMERO: «Primeras experiencias en el empleo de zeolita para la producción de posturas de *Pinus caribaea* var. *caribaea* destinadas a la reforestación de sabana serpentinoso en Camagüey», *Revista Forestal Baracoa* 20 (2): 83-87, 1990.
- PEÑA-PUENTE, F.: «Estandarización de un medio de cultivo para la propagación masiva de hongos ectomicorrícicos», *Rev. Ciencia Forestal*, vol.1, marzo-abril, no. 18:11-20, 1979.
- PERA, J.; J. PARLADÉ; I. ÁLVAREZ: «Eficacia del tipo de inóculo de *Pisolithus tinctorius* en la formación de micorrizas en *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii*», *Invest. Agrar., Sist. Recur. For.* 3(1): 1-12, 1994.
- SWART, W. J.; J. M. THERON: «Future Needs of Mycorrhizal Research in South African Forestry», *South African Forestry Journal* no. 153:31-35, 1990.
- WILSON, G. P.; F. A. MUMPTON: *Zeo-Agriculture: Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*, International Committes on Natural Zeolites, 1984.