

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**Síntesis de micorrizas en *Pinus caribaea* con cepas nativas de
Pisolithus tinctorius y *Scleroderma* sp. en contenedor**



Martha Lydia Reyes Salazar

Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2,004

ÍNDICE

Contenido	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
IV. Justificación	19
V. Objetivos	20
VI. Hipótesis	21
VII. Materiales y métodos	22
VIII. Resultados	30
IX. Discusión de resultados	43
X. Conclusiones	46
XI. Recomendaciones	47
XII. Referencias	48
XIII. Anexos	55

I. RESUMEN

En Guatemala, como en la mayoría de los países latinoamericanos, el problema de la deforestación es cada vez mayor, por lo que se ve necesario incrementar los esfuerzos para contrarrestar esta situación.

Una de las técnicas que se están utilizando para solucionar este problema es el uso de hongos micorrícicos para el mejoramiento de las plantas con las que se reforestará. Esta técnica se conoce como micorrización, la cual consiste en lograr la unión entre diversas especies de hongos y el sistema radicular de las plantas. En esta relación simbiótica el hongo se beneficia al obtener alimento y cobijo en la planta y esta se beneficia al obtener mayor cantidad de nutrientes provenientes del suelo, que le proporciona el hongo infectante.

El propósito de este trabajo fue evaluar la eficiencia micorrícica de los hongos nativos *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma* sp. 167.97 en plantas de *Pinus caribaea* nativos de Poptún, Petén y su efecto en el desarrollo de las plantas en contenedor. Se utilizaron estos hongos aprovechando la biodiversidad de especies existentes en nuestro país, nativos del área a reforestar para asegurar su adaptación ambiental además de producir cuerpos fructíferos con abundante cantidad de esporas y ser de fácil aislamiento del micelio vegetativo.

Para la micorrización se siguieron dos etapas: la primera fue a nivel de laboratorio, en la que se cultivaron los hongos en un medio de cultivo (MMN) y la segunda, a nivel de invernadero, donde se desarrollaron las plantas inoculadas con micelio crecido en turba-vermiculita en dos proporciones: 1:4 y 1:8 (volumen:volumen) durante cinco meses.

Además se utilizó un diseño totalmente al azar, dividido en cinco tratamientos y por medio de un análisis de varianza de una vía y el estadístico de Dunnett se comparó

el crecimiento y desarrollo de las plantas infectadas con las no infectadas, según la proporción de inoculación, midiendo los siguientes parámetros: altura, diámetro del tallo, longitud de la raíz, número de raíces principales, peso fresco total, peso fresco de la parte aérea, peso fresco de la parte radicular, peso seco total, peso seco de la parte aérea, peso seco de la parte radicular y porcentaje de micorrizas.

Los resultados obtenidos, indican que sí existe diferencia estadísticamente significativa en la medición de casi todos los parámetros evaluados, por lo que se demuestra la capacidad de micorrización de estos hongos y el beneficio en el desarrollo de plántulas de *Pinus caribaea*.

II. INTRODUCCIÓN

Micorrización es el proceso de unión entre las raíces de un vegetal y un hongo, el cual se produce de forma natural en la mayoría de los suelos. Este proceso desaparece en los ecosistemas degradados al agotarse la flora fúngica, así como por una continua labor del suelo e incendios repetidos, entre otros factores.

La presencia de hongos ectomicorrícicos en raíces de plantas que se utilizan para reforestar, ha demostrado ser una cualidad que mejora el crecimiento y resistencia de las mismas, por lo que ésta se ha empleado en programas de reforestación y aforestación en diversos países como Puerto Rico, Venezuela, Ecuador, España, Francia, Italia, Liberia, etc.

A pesar de la gran riqueza de hongos ectomicorrícicos y ante la continua deforestación que afronta el país, se han realizado pocos estudios sobre estos hongos y su empleo en micorrización.

Con el fin de contribuir a mejorar esta situación, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la eficiencia micorrícica de las cepas de hongos *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97, nativos de Poptún, Petén, aplicados a diferentes proporciones y su implicación en la mejora del crecimiento y desarrollo de plantas de *Pinus caribaea* en contenedor. Con ello se pretende ofrecer una alternativa para el mejoramiento de viveros forestales y contribuir a la reforestación y mejora de

plantaciones en el departamento de El Petén.

Para ello, se tomaron datos cuantitativos como altura, diámetro del tallo, longitud de la raíz, número de raíces principales, pesos frescos y pesos secos de las partes aérea y radicular, así como el porcentaje de micorrización y su relación con el grado de crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas, las cuales se compararon con testigos sin inocular. Los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía, no paramétrico, con un nivel de significancia de 0.05, así como el estadístico de Dunnett.

III. ANTECEDENTES

3.1. Definición de micorrizas

La palabra micorriza deriva de los términos griegos mico=hongo; rhiza=raíz (1,2). Las micorrizas son un tipo de asociación simbiótica que se establece con las plantas a nivel hipógeo, es decir, bajo el suelo, donde el micelio de un hongo, se relaciona íntimamente con la raíz de la planta (3-6).

También se define como la formación de raíces por la asociación simbiótica entre raíces finas nutridoras de las plantas verdes y hongos altamente especializados que habitan en las raíces (7). Esta se produce de forma natural en la mayoría de las plantas, tanto herbáceas, arbustivas y arbóreas, pero que desaparece en los ecosistemas degradados, por factores tales como la continua labor del suelo e incendios repetidos, entre otros, y que agotan la flora fúngica (1,3-5,8,9).

La mayoría de los árboles dependen de esa asociación para iniciar y mantener el desarrollo. Sin las micorrizas, muchísimas plantas incluyendo las especies madereras más importantes no podrían subsistir (3).

3.2. Tipos de micorrizas

Según publicaciones realizadas sobre micorrizas, se estima que el 95 por ciento de las especies de plantas vasculares pertenecen a familias característicamente micorrícicas (10,11). Debido a que las micorrizas poseen la forma simbiótica más extensa en el mundo vegetal, se ha hecho necesario, una clasificación de los distintos tipos micorrícicos.

Actualmente, se clasifican en dos tipos principales que se basa en la interrelación de los filamentos del hongo con las células de las raíces, en ectomicorrizas y endomicorrizas (3,12).

3.2.1. Características de las ectomicorrizas

Las ectomicorrizas se forman después que las esporas o filamentos del hongo entran en contacto e invaden las raíces absorbentes en crecimiento activo. La fuente de las esporas son los hongos que crecen en el suelo al pie de los árboles.

El micelio del hongo, estimulado por los elementos nutritivos de la raíz, cubre enteramente la punta de la misma con un manto de filamentos (red de Hartig) que se extiende al suelo circundante.

A medida que las células se dividen y alargan, el hongo penetra y crece entre las células de la raíz debido a la acción de las enzimas que secreta. La invasión del hongo queda restringida a las capas exteriores de las células de la raíz; ambos mantienen sus características vitales sin mostrar síntoma de enfermedad. A medida que las células vegetales infectadas se dividen y se alargan, las sustancias que segregan los hongos causan que las raíces sean más cortas que las no infectadas y hacen que se ramifiquen también (3,13,14).

3.3. Beneficio de las micorrizas

Los hongos micorrícicos son microorganismos benéficos estrechamente relacionados con las raíces de muchas plantas. Ellos les permiten absorber de muchos suelos, más elementos nutritivos (3). A continuación se citan una serie de beneficios para

las plantas:

- Aumentan el poder absorbente de las raíces, facilitando la entrada de agua y componentes minerales como fósforo, nitrógeno, potasio, nitratos, calcio, hierro, sodio, magnesio, y otros elementos (4,15).
- Aumento de resistencia a la sequía, a las bajas temperaturas y a la pobreza del suelo, sobre todo en las primeras etapas de vida (4).
- La actividad vital del hongo produce algunas sustancias que estimulan el crecimiento de la raíz, tales como vitaminas y hormonas vegetales (5).
- La presencia del hongo protege a las raíces contra ciertos microorganismos patógenos del suelo, principalmente mediante la intervención de inhibidores químicos que actúan a manera de antibiótico (5).
- Proporcionan además cierto grado de protección frente a los metales pesados contaminantes del suelo (4,15).

Las ventajas citadas anteriormente, redundan en un mayor crecimiento y resistencia de las plantas micorrizadas, en relación con otras desprovistas del hongo, además de incrementar la biodiversidad del terreno forestado, permitiendo de esta manera tener mayores garantías de éxito en el campo, frente a la sequía del verano (5,7).

Hoy día, una reforestación formal no puede concebirse sin tomar precaución de que las plantas estén provistas de micorrizas, es decir, de hongos en simbiosis con sus raíces, tal y como ocurre de forma espontánea en la naturaleza (16).

Respecto a la función profiláctica de las micorrizas frente a los principales parásitos de la raíz (*Phytophthora*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Alternaria*) ha sido demostrada para varias especies de hongos como *Hebeloma crustuliniforme* y *Laccaria laccata*, entre otros (5,17).

3.3.1. Absorción de agua y nutrientes

Como se mencionó anteriormente, las micorrizas facilitan la absorción de agua y nutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y otros elementos), ambas funciones íntimamente ligadas al ser absorbidos los elementos en solución, por medio del sistema radicular de las plantas. Se consideran de importancia económica y ecológica por ser la sequía y la escasez de nutrientes, los parámetros universalmente limitantes en la producción forestal (18).

En las plantas se distinguen morfológica y funcionalmente dos tipos de raíces laterales: raíces largas con ápices puntiagudos de crecimiento ilimitado y raíces cortas con ápices redondeados de crecimiento limitado (9,19,20). Las cortas son las susceptibles de ser infectadas por los hongos ectomicorrícicos y las responsables de la absorción de agua y nutrientes (3,9,19-22).

Aunque las raíces cortas representan menos del 1% de la biomasa total del árbol, en árboles no micorrizados estas raíces se renuevan entre dos y tres veces al año, o incluso más, si las condiciones de crecimiento del árbol así lo requieren, lo que representa un costo metabólico alto para el árbol (22,23).

Por el contrario, en árboles micorrizados, las raíces cortas ectomicorrizadas persisten aparentemente en estado funcional, hasta ocho años con un costo metabólico bajo para el árbol (10,17,21).

Considerando las grandes distancias inter-radiculares propias de la geometría de los sistemas radiculares de los árboles, la eficacia de las ectomicorrizas en la absorción

de agua y nutrientes se comprende por la profusa colonización del suelo, realizada por las estructuras fúngicas, sean éstas rizomorfos, acordonamientos miceliales o hifas, lo que permite una exploración grande del suelo en la captación de agua y nutrientes. Los acordonamientos miceliales permiten al hongo extenderse hasta cinco metros de la raíz en suelos pobres en nutrientes (17).

Trappe y Fogel (1977), lograron trazar una sola hifa de *Cenococcum*, emergente de una ectomicorriza de *Pseudotsuga* a lo largo de dos metros, observando su conexión no sólo con otras ectomicorrizas de esta especie, sino también de *Tsuga* (10).

Los hongos formadores de rizomorfos o de cordones miceliales están frecuentemente asociados a una mayor tolerancia de la planta a la sequía como se demostró para las asociaciones de *Pinus radiata* + *Rhizopogon luteolus* (24), *Pseudotsuga menziesii* + *R. vinicolor* (25) y *Quercus velutina* + *Pisolithus tinctorius* (26).

Debido al papel tan importante que juegan las micorrizas en el metabolismo de las plantas, los estudios sobre absorción de nutrientes se remontan desde 1,884 con las investigaciones de Frank sobre la absorción de nitrógeno (27).

Después de los trabajos de Hatch en 1937, quien citó grandes incrementos en la absorción de nitrógeno, fósforo y potasio por raíces micorrizadas de pino, se inició una época que se extiende hasta nuestros días de investigación constante e intensa sobre la absorción de fosfatos, nitratos, amonio, Ca, Rb, Cl, Na, Mg, Fe y otros elementos, así como la fisiología de la absorción de iones y su traslocación (15,27,28).

3.3.2. Producción de reguladores del crecimiento

La investigación sobre producción de hormonas por hongos ectomicorrícicos fue

iniciada con la detección de compuestos indólicos en micorrizas de *Pinus sylvestris* y *Pinus strobus*, además de estudios relacionados con auxinas, citoquininas, giberelinas y vitaminas del grupo B (29).

La concentración de auxina en raíces de plantas no micorrizadas parece ser subóptima, por lo que se considera que el exceso de este regulador suministrado por el hongo micorrícico, influye significativamente en el crecimiento y desarrollo de la planta (15,29).

Otros efectos de la simbiosis están relacionados con la actividad hormonal, entre los que cabe destacar: el geotropismo de las raíces, la inhibición de la formación de pelos radiculares, el incremento de la longevidad de las raíces cortas a través de la inhibición o reducción de la suberización de la endodermis y de la zona cortical, el incremento en el desarrollo de los cloroplastos y la traslocación de nutrientes (22,29).

Otro regulador de crecimiento es el etileno; en un estudio realizado con 23 hongos, se encontró que 19 cepas producían etileno, sin la presencia de metionina, por el contrario cepas como *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* y *Pisolithus tinctorius* necesitaban la presencia de metionina en el medio de cultivo para producir etileno. Cuando algunas plantas fueron inoculadas con dichas cepas, la formación de las ectomicorrizas coincidió con la producción de etileno y se detectó un incremento en el desarrollo de las raíces laterales (30).

Otras especies en que ha sido detectada la metionina de exudados de raíces son *Pinus radiata* (31) y *Eucalyptus calophylla* (32).

Para determinar el efecto de este compuesto, se expusieron plantas de *Pinus*

ponderosa, *Pseudotsuga menziesii* y *Abies concolor* a una atmósfera de 5 ppm de etileno durante un mes, lo que resultó en un incremento de la sobrevivencia, rotura de yema apical y desarrollo de nuevas raíces, cuando fueron trasplantadas a invernadero, sin embargo, estos efectos no se observaron cuando el trasplante se hizo en el bosque (18).

3.4. Inoculación artificial de micorrizas

La introducción artificial de hongos micorrícicos es utilizada para asegurar una buena micorrización en plantas producidas en viveros; sin embargo se deben desarrollar procedimientos para la inoculación con hongos adecuados, especialmente según el hábitat de destino y el tipo de planta. Además conviene, de ser posible, aislarlos en algún agar nutritivo.

Algunos parámetros que se deben considerar en la inoculación de plantas de invernadero con micelio, son los siguientes (33):

1. Que los hongos sean de fácil aislamiento.
2. Que el micelio presente una tasa importante de crecimiento en cultivo puro.
3. Que los cultivos presenten efectividad como inóculo en el hospedero.
4. Que los inóculos sean efectivos sobre el crecimiento y vigor del hospedero.
5. Que las cepas presenten adaptación ecológica y variación ecotípica.
6. Que las cepas interactúen con otros microorganismos.
7. Que los hongos presenten especificidad con el hospedero.

También debe cuidarse el suministro de nutrientes y agua para adaptar de mejor

manera las condiciones del vivero y la simbiosis planta-hongo.

Los hongos micorrícicos, necesitan un pH óptimo, entre 4.5 a 5.0 ó más, una temperatura entre 18 y 25 grados centígrados, un ambiente de aerobiosis, disponibilidad de nitrógeno y potasio para su desarrollo y crecimiento(9).

La introducción de cepas de hongos micorrícicos se puede realizar de las siguientes formas: suelo, planta micorrizada, esporas y micelio (12).

3.4.1. Utilización de suelo

Este procedimiento consiste en utilizar sustrato natural o humus (broza) como inóculo, que puede ser recolectado en bosques y plantaciones establecidas. Es un procedimiento perfectamente válido, sobre todo para la transmisión de micorrizas ectótrofas, pero es bastante más costoso ecológicamente que otras técnicas. Además tiene el inconveniente de introducir agentes perjudiciales, como larvas de insectos, algunos patógenos y semillas de malas hierbas (5,9).

3.4.2. Inoculación de semillas

Un segundo procedimiento se lleva a cabo mediante la pulverización de carpóforos o setas maduras, que luego se mezcla con polvo inerte (arena, caolín, aserrín) que le sirve de soporte, y con goma arábica como adherente. Con esta mezcla se recubre la semilla, de manera que queda lista para su siembra. Presenta como ventaja principal, la proximidad que existe entre el material fúngico y la planta, sobre todo en los inicios del crecimiento radicular (5,12).

Esta técnica, emplea semillas de las plantas a micorrizar que estén sanas,

pesadas y maduras. No conviene recogerlas del suelo porque estarán contaminadas.

Se recomienda desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio, nitrato de plata al 0.1 % o peróxido de hidrógeno al 30 % (5,12).

3.4.3. Utilización de esporas

Este tercer procedimiento se realiza a partir de un inóculo de esporas de hongos que producen numerosas basidiosporas y que son fáciles de recolectar en grandes cantidades, como: *Rhizopogon*, *Scleroderma* y *Pisolithus* (34). Se dejan esporular los carpóforos sobre una lámina de aluminio (generalmente vidrio, para evitar la desecación) y se lavan las esporas con agua destilada recogéndolas en un recipiente. También se pueden dejar esporular los carpóforos directamente sobre agua destilada.

De este modo se obtiene una solución de esporas, utilizable en riego o para sumersión de semillas previamente a su siembra, sobre todo en viveros. Esta técnica se aplica tanto a semillas como a plantas de vivero (5,12,34).

Es importante realizar una fertilización folialmente a las plantas inoculadas con las esporas del hongo, cada quince días. Finalmente, al observar un buen porcentaje de micorrización, las plantitas se transplantan al terreno definitivo (35).

3.4.4. Inóculo miceliar

Es uno de los procedimientos más empleados, su utilización requiere que el inóculo sea puro y obtenido en condiciones asépticas, sin embargo, esto último puede ser complicado ya que muchas cepas son difíciles de aislar, otras no crecen en cultivo puro o crecen lentamente y otras no sobreviven (12).

Dicha técnica consiste en obtener micelio a partir de fragmentos de hongos, en un medio sólido, generalmente MMN (Melin-Norkrans Modificado), luego se coloca el agar con micelio en un medio líquido, para que haya aumento de biomasa. Se preparan frascos de tapón de rosca conteniendo una parte de turba de *Sphagnum* con una parte de vermiculita tamizadas y seis partes de medio líquido nutritivo, previamente esterilizados, los cuales se inoculan con el micelio producido en medio líquido MMN y se espera a que crezca (9).

La producción del inóculo se ha realizado en un sustrato de turba y vermiculita, en una proporción de (1:1). La turba procede del musgo *Sphagnum*, no tiene ningún fertilizante añadido, posee una gran capacidad de retención de agua y es el más utilizado como sustrato.

La vermiculita tiene la conveniencia de expandirse a altas temperaturas, formando partículas que encierran pequeñas cantidades de aire en el sustrato. Químicamente posee salicato de magnesio, aluminio y hierro hidratado, con buena capacidad de tampón y de intercambio catiónico con lo que puede liberar nutrientes. La combinación de los dos sustratos brindan las siguientes ventajas:

1. Ligereza de peso lo que permite facilidad de operación.
2. Uniformidad en la composición, precio accesible y disponibilidad.
3. Relativamente libre de plagas y enfermedades.
4. Elevada capacidad de intercambio catiónico.
5. Elevada capacidad de almacenamiento de agua.
6. pH ácido.

7. Buena aireación y drenaje lo que favorece el desarrollo de las raíces cortas (9).

3.5. Factores que afectan el desarrollo de una buena micorrización

Existen factores como el agua, la temperatura, pH y la fertilización que son determinantes para lograr una buena micorrización.

En saturación de agua, las plantas desarrollan un tipo de raíces gruesas y carnosas (raíces de agua) que actúan como verdaderas esponjas de acumulación y no producen raíces micorrizables (9,12).

Otro factor es la temperatura que afecta en menor medida a la viabilidad del hongo, y por lo tanto, al proceso de micorrización. El rango de temperatura en el que pueden sobrevivir los hongos micorrícicos es amplio, oscilando entre los 0 y 38 grados centígrados, aunque esto depende evidentemente de la especie (12,36).

El pH del suelo y el uso de especies vegetales o fúngicas determinadas, no es un factor crítico para el proceso de micorrización. Es cierto que cada hongo tiene un óptimo de crecimiento a un determinado pH, pero su viabilidad suele estar asegurada en un amplio rango que va de cuatro a seis (9,12).

En cuanto al uso de fertilizantes, conviene utilizar soluciones bajas en fósforo, nitrógeno y potasio, evitando cualquier elemento contaminante, metales pesados, fungicidas, herbicidas, etc., debido a que tendrá un efecto negativo en la viabilidad del hongo y de la planta, por consiguiente sobre el proceso de micorrización (12, 36).

3.6. Aplicaciones prácticas de las ectomicorrizas

Debido a la asociación simbiótica entre raíces de plantas y hongos, su utilización puede ser orientada a programas de reforestación. Se forman solamente con el 5% de

plantas vasculares, en las que predominan familias de importancia económica como *Pinaceae*, *Fagaceae* y *Betulaceae*. La importancia de éstas especies en aforestación y reforestación quedó ampliamente probada en los estudios pioneros realizados por Vozzo y Hacskeylo a lo largo de dos décadas, tratando de establecer plantaciones de diversos *Pinus* en Puerto Rico, donde no existía inóculo natural (38). Entre los hongos facultativamente ectomicorrícicos de gran importancia en el mantenimiento de los bosques se mencionan: *Suillus spp.*, *Scleroderma spp.*, *Pisolithus tinctorius*, *Lactarius spp.*, *Amanita caesarea*, *Laccaria laccata*, *Boletus spp.*, pertenecientes a la clase de Basidiomicetos, sub-clase Gasteromicetos, de la familia *Licoperdáceos* (39).

De éstos, el más utilizado ha sido *Pisolithus tinctorius*, el cual se adapta a climas cálidos y secos, resistente a sequías y diversos grados de alcalinidad, características que comparte con *Scleroderma spp.*, según cepas encontradas en diversas partes del mundo (7,11,12).

De la biodiversidad de cepas micorrícicas existentes en Guatemala, Urizar (1999) (40) demostró la capacidad infectiva de cepas nativas de *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma sp.*, así como una cepa extranjera de *Laccaria laccata* A-127 al inocular plántulas de *Pinus maximinoi*, obteniendo 84, 12 y 76 por ciento de micorrización respectivamente a dosis diferentes, por lo tanto recomienda a las tres cepas ensayadas como inóculo para plantas forestales (40).

También se ha micorrizado con especies de *Laccaria aff bicolor* y *Suillus aff brevipes*, aisladas en Guatemala, sobre plantas de *Pinus ayacahuite*, *Pinus rudis*, y *Pinus hartwegii*, logrando muy buena capacidad infectiva, notando incremento y

desarrollo de las plantas, en contenedor (41).

Cabe mencionar, que la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacias de la USAC, inició una época de mucho interés e investigación sobre este tema, con el primer estudio taxonómico de hongos ectomicorrícicos del país, específicamente del área de la Sierra de los Cuchumatanes asociados a pino y pinabete, abarcando desde el aislamiento y cultivo de cepas para la producción de planta forestal micorrizada y el trasplante a campo definitivo en la aldea Tuicoj, del municipio de Todos Santos Cuchumatán (42). Así como la realización de proyectos con hongos ectomicorrícicos asociados a *Abies guatemalensis*, *Pinus rudis* y *Pinus ayacahuite* también de la Sierra de los Cuchumatanes (43).

Sobre esta clase de hongos, se deriva un sin fin de temas de investigación, tales como el aumento de la biomasa, ciclos de nutrientes (44,45), el papel de los animales en el bosque como distribuidores de los hongos (46,47), la dependencia de la vida silvestre sobre este tipo de hongos para su nutrición y sobrevivencia (11, 48), parámetros que determinan la fructificación de dichas especies (49, 50), las consecuencias en la utilización de diversas especies de hongos (51, 52), etc.

3.7. Descripción general de la especie de pino utilizada

3.7.1. Distribución natural de *Pinus caribaea*

La planta de *Pinus caribaea* se desarrolla en altitudes cercanas a los 1000 metros, a partir de los 800 metros empieza a ser reemplazado por *Pinus oocarpa* en la zona norte hacia el Caribe (53, 54).

La distribución está definida por el tipo de suelo y/o el clima, en el Este del

departamento de Alta Verapaz, Norte de Izabal, Sierra de las Minas, en el Valle del Motagua y sobre todo en Poptún, departamento del Petén (53,54,55).

En otros países, están distribuidas otras especies, por ejemplo, en las Bahamas y las islas Caicos está *Pinus caribaea* var. *Bahamensis*; en Cuba, en la Isla de Pinos, se encuentra *Pinus caribaea* var *caribaea* (53).

En Poptún, departamento de El Petén, existe uno de los rodales internos más conocidos de *Pinus caribaea* variedad *hondurensis*, los cuales son muy importantes como proveedores de semilla, actualmente estos bosques están siendo destruidos por el gorgojo (*Dendroctonus*) y talas incontroladas (54,55).

La planta compite con árboles latifoliados de acuerdo a las incidencias de los huracanes, fuego o interferencias humanas; no está sujeto a heladas pero sí a condiciones adversas, especialmente a condiciones propias del suelo (54,55).

3.7.2. Crecimiento de las plantas

El crecimiento de la planta se refiere al aumento de la masa forestal (número de plantas) o de las características de la planta como diámetro, área basal, altura, copa, número de raíces, que están influenciados por las condiciones del medio o por tratamientos silvícolas. Se puede utilizar el término “incremento” que relaciona el crecimiento con un período de tiempo determinado (56,57).

El diámetro es un buen indicador del desarrollo de las plantas, se ve influenciado por el medio ambiente, de modo particular la intensidad lumínica, el espacio entre plantas y la lluvia, tal como lo demostró Loján con *Pinus caribaea* (58).

La altura está relacionada con la edad, es más acentuada en la juventud de las

plantas. Se ve afectada principalmente por la altitud del terreno y la fertilidad del suelo.

En el caso de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, presenta una altura de 38 m. en el área de Poptún, Petén (55).

La rapidez del crecimiento depende de una serie de factores no siempre fáciles de reconocer. En primer lugar, el sitio y la fertilidad del suelo, el clima y sus variaciones; luego la edad (las plantas viejas casi no crecen), los factores genéticos (especies, razas, etc.) y por último la competencia de otras plantas mayormente los árboles (56).

IV. JUSTIFICACIÓN

La inoculación de los hongos ectomicorrícicos nativos *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 en plantas de *Pinus caribaea*, una especie mesoamericana de rápido crecimiento y que se desarrolla en ambientes generalmente cálidos y susceptibles a incendios forestales, puede inducir un proceso de simbiosis, en el que se obtengan claros beneficios en crecimiento y protección de la planta, debido a un incremento en la absorción de agua y nutrientes del suelo por parte del hongo.

Con este trabajo se confirmó la capacidad micorrícica de dos cepas nativas de estos hongos y el efecto benéfico sobre las plantas de *Pinus caribaea*, ya que esta especie forestal puede ser utilizada en programas de reforestación de las áreas de El Petén que han sido deforestadas, quemadas y abandonadas.

De esta manera se estará contribuyendo a evitar la erosión, a proteger la flora y fauna endémica y colaborar a la preservación del principal pulmón verde del área mesoamericana.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia micorrícica de dos cepas nativas de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 de El Petén, sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en vivero de *Pinus caribaea* en contenedor.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Determinar la capacidad micorrícica de las cepas *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 en plantas de *Pinus caribaea* en contenedor.

5.2.2. Determinar la mejor proporción de inóculo miceliar para la producción de micorrizas en plantas de *Pinus caribaea*, en contenedor.

5.2.3. Comparar el efecto que se observa en el desarrollo de plantas de *Pinus caribaea* inoculadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 frente a las plantas sin inóculo.

5.2.4. Describir morfológicamente las ectomicorrizas formadas de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 con *Pinus caribaea*.

VI. HIPÓTESIS

- 6.1. Los hongos ectomicorrícicos nativos *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma* sp. 167.97 contribuyen a mejorar el crecimiento y desarrollo de plantas de *Pinus caribaea* en contenedor.

- 6.2. La proporción 1:4 de las cepas nativas de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma* sp. 167.97 producen un mayor porcentaje de micorrizas en plantas de *Pinus caribaea* que la proporción 1:8.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo de trabajo

El universo de trabajo estuvo constituido por la interacción simbiótica entre las raíces de *Pinus caribaea* y el micelio de los hongos nativos *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 de Poptún, Petén.

7.2. Muestra

Raíces de plantas de *Pinus caribaea* que fueron inoculadas con dos especies de hongos nativos (*Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97).

Las cepas de los dos hongos son provenientes de Poptún, Petén y fueron proporcionadas del cepario de hongos saprófitos y micorrícicos del departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Las plantas de pinos utilizadas fueron cultivadas a partir de semillas proporcionadas por el Banco de Semillas Forestales del Instituto Nacional de Bosques (INAB).

7.3. Recursos

7.3.1. Recursos humanos:

Autora del trabajo: Br. Martha Lidia Reyes

Asesor de Tesis: Dr. Roberto Flores Arzú

Co-asesor de Tesis: Lic. Osberth Morales Esquivel

Personal de apoyo del Depto. de Microbiología

7.3.2. Recursos Institucionales:

- a) Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- b) Centro de Experimentación Agrícola (CEDA), Facultad de Agronomía, USAC.
- c) Instituto Nacional de Bosques (INAB).

7.4. Materiales

7.4.1. Equipo:

- a) 1 incubadora bacteriológica a 25⁰ C y 37⁰
- b) 1 autoclave a 121⁰ C
- c) 1 microscopio binocular con escala micrométrica
- d) 1 estereoscopio
- e) 1 campana de flujo laminar
- f) 1 balanza analítica
- g) 1 balanza semianalítica
- h) 1 espátula
- i) 1 incinerador, mechero, fósforos
- j) 2 asas de nicromo
- k) 2 pinzas
- l) 1 regla, 1 vernier
- m) 1 tabla de colores de Methuen
- n) 1 cámara fotográfica
- ñ) 24 contenedores plásticos

7.4.2. Cristalería:

- a) 5 cajas de petri
- b) 15 frascos pyrex de 250 mL con tapa de rosca
- c) 5 frascos pyrex de 2,000 mL con tapa de rosca
- d) 10 erlenmeyer de 200 mL
- e) 10 erlenmeyer de 500 mL
- f) 5 erlenmeyer de 2,000 mL
- g) 5 beaker de 2,000 mL
- h) agitadores, pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mL

7.4.3. Otros materiales:

- a) cajas de madera de 1x50x50 cm
- b) 12 yardas de tela de gasa
- c) papel parafilm, algodón, papel para envolver, cáñamo.

7.4.4. Reactivos:

Peróxido de hidrógeno al 30 %, cloro, alcohol al 70 y 95 %, agua destilada.

7.4.5. Medios de cultivo:

Agar Melin-Norkrans Modificado (MMN), caldo y sólido

Turba de *Sphagnum* Fafard Peat Moss

Vermiculita VERGRO

7.5. Metodología

7.5.1. Producción de inóculo miceliar en sustrato de turba y vermiculita

La producción de inóculo miceliar en sustrato de turba y vermiculita se llevó a cabo según la técnica descrita por Pera (9), con algunas modificaciones.

A partir de cuerpos fructíferos de los hongos colectados en el área de Poptún, Petén (foto 1), se obtuvo un cultivo puro de las especies ensayadas en medio de Melin-Norkrans Modificado (MMN) (anexo 13.1).

Los cultivos puros fueron proporcionados del cepario de hongos micorrícicos con que cuenta el departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Las cepas fueron trasladadas a cajas de petri conteniendo el medio MMN sólido, e incubándolas a 25 °C. durante 30 días. Una vez crecidas las cepas se tomaron 5 porciones de 1 cm x 1 cm que se agregaron a frascos de tapón de rosca con capacidad de 250 mL, conteniendo 70 mL del medio MMN líquido previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

Los frascos se incubaron a 25 °C por 30 días aproximadamente, hasta obtener abundante crecimiento miceliar; debido a que no era suficiente inóculo, se incrementó la biomasa.

Para ello se utilizaron frascos de tapón de rosca de 2 litros de capacidad, a cada frasco se le agregó 1,100 mL de vermiculita más 100 mL de turba tamizadas y 600 mL de medio líquido MMN, mezclados homogéneamente y autoclaveados a 121 °C por 20 minutos, luego se inocularon en un ambiente estéril, fragmentos de micelio obtenido en los frascos de 250 mL y se incubaron a 36 °C en el Laboratorio de Microbiología, del departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hasta obtener un crecimiento uniforme, aproximadamente 60 días.

7.5.2. Germinación de semillas

Las semillas de *Pinus caribaea* se lavaron en agua corriente dejándolas por 12 horas en reposo, descartando las que flotaron. Las que sedimentaron fueron tratadas con H_2O_2 al 30% durante 2 minutos para desinfectarlas, lavándolas con una cantidad suficiente de agua destilada estéril, tratando de eliminar todo el peróxido de hidrógeno. Realizado este paso, se dejaron en una caja de petri con suficiente humedad hasta su germinación.

7.5.3. Preparación del substrato turba y vermiculita

Como substrato para la inoculación de los hongos se utilizó, turba Fafard Peat Moss y vermiculita VERGRO, las cuales se tamizaron en cedazos finos a un grado 2; es decir, 2 mm de diámetro de tamaño de partícula que posteriormente se esterilizó en bolsas de polypapel, a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

7.5.4. Lavado de contenedores

Los contenedores se lavaron muy bien con un cepillo, jabón y agua. Se agregó cloro para desinfectarlos y posteriormente agua, evitando dejar residuos que pudieran dañar el inóculo de los hongos.

7.5.5. Inoculación de plantas con micelio

Para evaluar la eficiencia micorrícica de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma* sp. 167.97 se establecieron dos proporciones de inóculo miceliar, 1:4 y 1:8.

Para la primera proporción se tomó tres partes de la mezcla turba/vermiculita tamizada y esterilizada (1:1, V/V), con una parte del micelio.

Para la proporción 1:8 se tomó siete partes de la mezcla turba/vermiculita (1:1, V/V) con una parte del micelio. Con la mezcla se llenaron 30 pozos en total (10 por cada contenedor) para cada tratamiento, en los que se sembró en forma aleatoria, una semilla de *Pinus caribaea* ya germinada (foto 2).

Para las plantas control, se llenó el mismo número de pozos pero únicamente con turba/vermiculita sin inóculo y la semilla germinada de *Pinus caribaea*.

Los tratamientos quedaron divididos de la siguiente forma:

- 30 plantas tratadas con micelio en proporción de 1:4 de *P. tinctorius* 17.07.98.
- 30 plantas tratadas con micelio en proporción de 1:8 de *P. tinctorius* 17.07.98.
- 30 plantas tratadas con micelio en proporción de 1:4 de *Scleroderma sp.* 167.97.
- 30 plantas tratadas con micelio en proporción de 1:8 de *Scleroderma sp.* 167.97.
- 30 plantas sin micelio utilizadas como control.

7.5.6. Mantenimiento de plantas micorrizadas en invernadero

Las plantas experimentales se dejaron crecer en un ambiente de invernadero, en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CEDA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Cada dos días se regaron, tratando de evitar contaminación.

También se fertilizaron cada 15 días por aspersión, empleando una solución con 3.26 g de fertilizante a base de quelatos como el 20-10-20 NPK (Peter Profesional M-77) y 0.24 g de una fuente de micronutrientes (STEM Peter Profesional) disueltos en dos litros de agua. Los contenedores se colocaron entre cajas de madera, colgadas y cubiertas con

gasa para protegerlas de las hormigas.

7.5.7. Análisis de plantas micorrizadas

Después de 5 meses de crecimiento, se midieron los siguientes parámetros indicativos de crecimiento y desarrollo de las plantas:

- a) Altura: Se midió con una regla la altura de la planta desde el hipocótilo hasta la copa.
- b) Diámetro del tallo: Con un vernier se tomó el diámetro en la región de inicio de las yemas primarias.
- c) Número de raíces principales: Se realizó un conteo simple de las raíces principales formadas.
- d) Longitud de la raíz principal: Se midió con una regla desde el hipocótilo hasta la cofia.
- e) Pesos frescos: Con una balanza semi-analítica se pesaron por separado las siguientes partes de la planta:
 - i. Total: Se pesó toda la planta incluyendo la parte foliar y radicular.
 - ii. Parte aérea: se pesó únicamente la parte foliar.
 - iii. Parte radicular: se pesó únicamente la parte de la raíz.
- f) Peso seco: Se procedió igual al peso fresco, con la diferencia de que las plantas se

secaron al horno a 30⁰ C por tres días.

g) Porcentaje de micorrización: Se obtuvo por medio del conteo del número de raíces cortas formadas en las raíces laterales como en la raíz principal y el conteo del número de raíces cortas micorrizadas, utilizando la siguiente fórmula: $\% M = (rm / rc) \times 100$

donde: % M = Porcentaje de micorrización

rm = Número de raíces cortas micorrizadas

rc = Número de raíces cortas totales

h) Descripción morfológica de las micorrizas:

Las micorrizas formadas se observaron al estereóscopo, se anotaron las características como apariencia, color, tamaño, presencia de cordones miceliares y rizomorfos. Para ello se empleó la guía de micorrizas de Varma y Hock (6) y la tabla de colores de Methuen (59).

7.6. Diseño y análisis de la investigación

a) El diseño del estudio fue un modelo totalmente al azar.

b) Para el análisis de los resultados obtenidos se aplicó un análisis de varianza de una vía, no paramétrico (Kruskal-Wallis), para determinar diferencia significativa en cada parámetro entre tratamientos inoculados, a un nivel de significancia de 0.05 (Alfa=0.05). Además se realizaron comparaciones pareadas de cada tratamiento de plantas micorrizadas vrs. plantas no micorrizadas utilizadas como control, por medio de el estadístico de Dunnett para determinar diferencia significativa en cada parámetro, como indicadores de desarrollo.

VIII. RESULTADOS

8.1. Parámetros evaluados como indicativos de crecimiento y desarrollo de las plantas

Se evaluó la eficiencia micorrícica de los hongos en las dos proporciones de inóculo, aplicando un análisis de varianza, andeva de una vía, no paramétrico, encontrando diferencia estadísticamente significativa en la mayoría de los parámetros medidos, entre los diferentes tratamientos de plantas micorrizadas. De esta manera se rechaza la hipótesis nula, **H₀** (no existe diferencia significativa entre los tratamientos).

Según el análisis estadístico de Dunnett para cada parámetro de las plantas micorrizadas vrs. control, se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa para cada parámetro (altura, diámetro, peso fresco, peso seco, número de raíces principales y longitud de raíces principales) (tabla 1). Esto confirma que las plantas de pino micorrizado presentan un mejor desarrollo que las plantas de pino sin micorrizar (control).

TABLA 1. Parámetros evaluados para determinar el desarrollo de *Pinus caribaea* micorrizados comparados con plantas control

Cepas		<i>Pisolithus tinctorius</i> 17.07.98		<i>Scleroderma spp</i> 167.97		¹ Control
Relación inóculo / turba-vermiculita		1:4	1:8	1:4	1:8	
Parámetros	Variables					
Altura	² X±DE	14.11cm±1.12	14.64cm±2.95	11.11 cm ±1.22	14.68 cm ±1.61	10.54cm±1.56
	³ Min-	12.0 cm	9.0 cm	9.0 cm	11.5 cm	7.4 cm
	⁴ Máx.	16.0 cm	21.0 cm	15.0 cm	17.0 cm	13.0 cm
	⁵ Valor P	*5.83 x 10 ⁻²⁴	*5.83 x 10 ⁻²⁴	*5.83 x 10 ⁻²⁴	*5.83 x 10 ⁻²⁴	-----
	⁶ Valor Dunnett	3.575	4.105	0.578	4.146	1.075
Diámetro del tallo	X±DE	1.4 mm ±0.28	1.38mm±0.24	1.49 mm ± 0.38	1.37 mm±0.196	1.19 mm ± 0.23
	Min-	1.0 mm	1.0 mm	1.0 mm	1.0 mm	1.0 mm
	Máx.	1.9 mm	1.9 mm	2.0 mm	1.8 mm	1.9 mm
	Valor P	*3.16 x 10 ⁻⁴	*3.16 x 10 ⁻⁴	*3.16 x 10 ⁻⁴	*3.16 x 10 ⁻⁴	-----
	Valor Dunnett	0.207	0.187	0.293	0.177	0.162
Longitud de raíz primaria	X±DE	11.45cm±2.55	11.96 ± 1.83	13.8 ± 1.28	11.15 ± 1.29	14.97 ± 1.035
	Min-	9.0 cm	8.0 cm	11.0 cm	9.0 cm	12.5 cm
	Máx.	18.5 cm	15.0 cm	15.5 cm	13.2 cm	17.0 cm
	Valor P	*1.53x10 ⁻²⁰	*1.53 x 10 ⁻²⁰	*1.53 x 10 ⁻²⁰	*1.53 x 10 ⁻²⁰	-----
	Valor Dunnett	-3.527	-3.017	-1.180	-3.827	-0.987
No. de raíces principales	X±DE	15.83 ± 2.51	12.57 ± 3.54	9.67 ± 2.09	13.53 ± 2.47	16.07 ± 4.10
	Min-	11	7	4	9	8
	Máx.	20	18	15	17	28
	Valor P	*1.876x10 ⁻¹⁶	*1.876x10 ⁻¹⁶	*1.876x10 ⁻¹⁶	*1.876x10 ⁻¹⁶	*1.876x10 ⁻¹⁶
	Valor Dunnett	-0.241	-3.508	-6.408	-2.541	1.747
Porcentaje de micorrización	X±DE	74.31 ± 7.49	79.96 ± 13.9	71.09 ± 7.09	68.64 ± 3.99	0.00
	Min-	58.18	75.86	56.20	60.50	0.00
	Máx.	85.26	88.23	96.91	75.90	0.00
	Valor P	*1.04x10 ⁻⁹⁷	*1.044 x 10 ⁻⁹⁷	*1.044 x 10 ⁻⁹⁷	*1.044 x 10 ⁻⁹⁷	
	Valor Dunnett	74.306	79.968	71.086	68.344	4.5916

¹Control= pinos sin micorrizar.

²X±DE= media y desviación estándar.

³Min= valor mínimo.

⁴Máx=valor máximo.

⁵Valor P= valor de la probabilidad = 0.05.

⁶ Dunnett= comparación pareada de cada tratamiento vrs. control (test Dunnett).

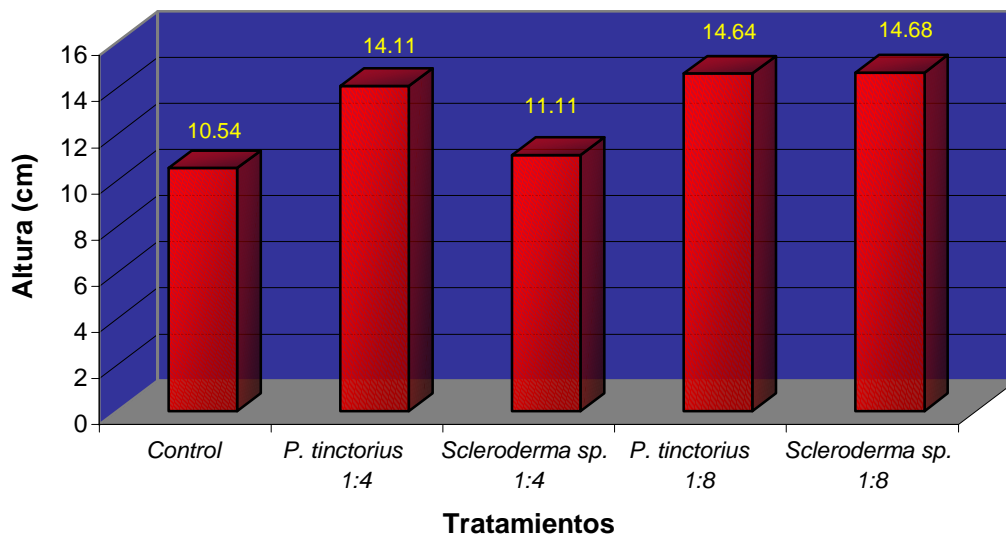
* Estadísticamente diferente al control. Ver análisis en tablas de anexos.

En relación a la altura alcanzada por las plantas (tabla 1), se puede observar que las inoculadas con *Scleroderma sp.* 167.97, fueron las que alcanzaron la mayor altura (14.68 ± 1.61 cm.).

Las inoculadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 alcanzaron una altura similar (14.11 ± 1.12 a 14.64 ± 2.95 cm) y las plantas control una altura menor ($10.54 \text{ cm} \pm 1.56$).

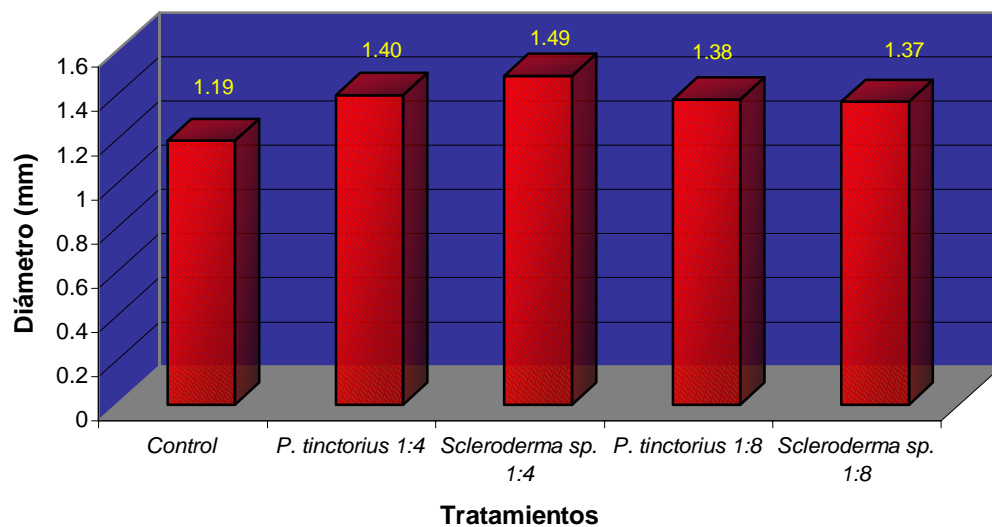
Los análisis estadísticos aplicados indican la existencia de una diferencia significativa en cuanto a este parámetro, especialmente frente al control (figura 1).

Figura 1. Altura de las plantas micorrizadas comparadas con el control



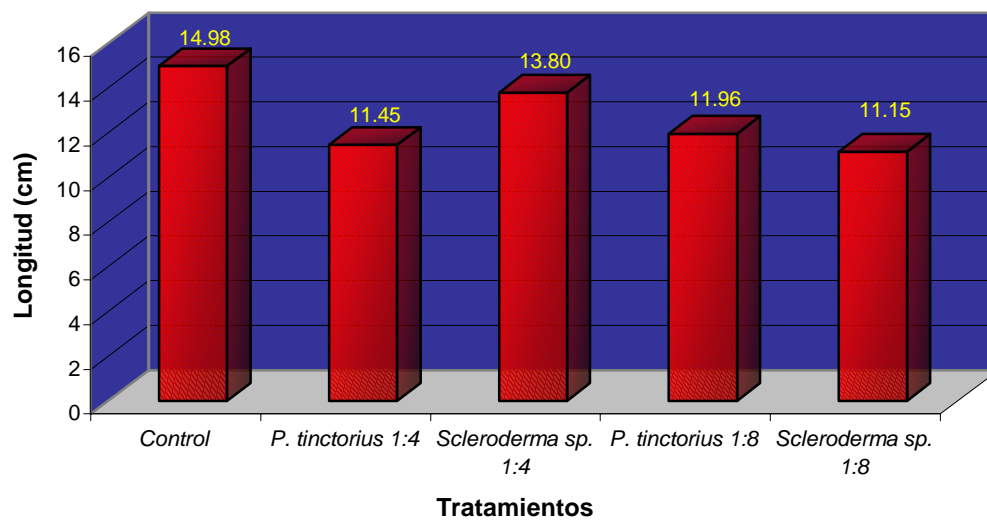
Otro de los parámetros evaluados fue el diámetro del tallo, el cual presentó poca diferencia entre los tratamientos inoculados; sin embargo, al comparar con las plantas control éstas mostraron un tallo más delgado, que además indicó diferencia estadísticamente significativa (tabla1, figura 2).

Figura 2. Diámetro del tallo de las plantas micorrizadas comparadas con el control



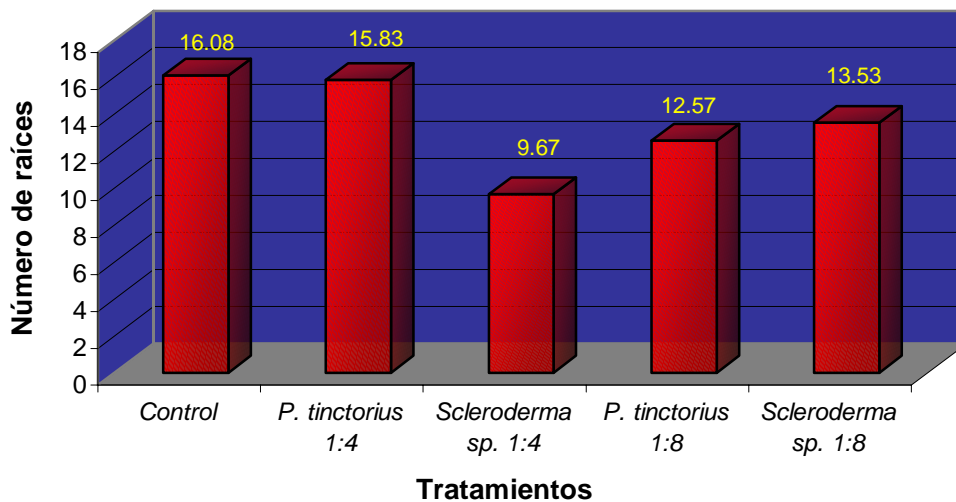
También se evaluó la longitud de la raíz primaria, encontrando que las plantas usadas como control desarrollaron una raíz más larga que las plantas micorrizadas, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa (tabla1, figura 3).

Figura 3. Longitud de la raíz de las plantas micorrizadas comparadas con el control



Junto a este parámetro se evaluó el número de las raíces principales, donde coincidentemente las plantas control formaron más raíces principales que las plantas micorrizadas. Entre tratamientos inoculados se observó diferencia estadísticamente significativa; donde las plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 formaron un mayor número de raíces principales respecto a *Scleroderma sp.* 167.97 (tabla1, figura 4).

Figura 4. Número de raíces principales de las plantas micorrizadas comparadas con el control



Se realizó un conteo de micorrizas para obtener el porcentaje de micorrización y evaluar la capacidad infectiva del hongo.

Con base a los resultados presentados en la Tabla 1, se puede observar que la cepa nativa de *Pisolithus tinctorius* 17.07.97 fue el hongo más efectivo y con mayor capacidad infectiva en la producción de micorrizas.

En cuanto a las proporciones de inóculo ensayadas, la proporción 1:8. resultó ser la más efectiva. Estadísticamente también se encontró diferencia significativa en el porcentaje de micorrización entre los cuatro tratamientos inoculados, así como entre los tratamientos y el control (figura 5, foto 3 y 4).

Figura 5: Porcentaje de micorrización de las plantas comparadas con el control

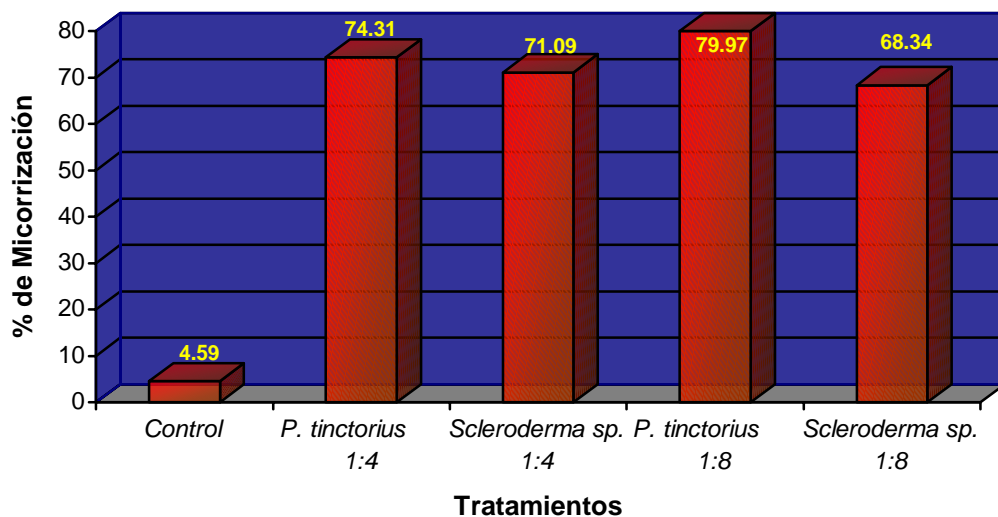


TABLA 2. Parámetros evaluados para determinar el desarrollo de *Pinus caribaea* micorrizados comparados con plantas control

Cepas		<i>Pisolithus tinctorius</i> 17.07.98		<i>Scleroderma</i> sp. 167.97		Control
Relación inóculo / turba-vermiculita		1:4	1:8	1:4	1:8	
Parámetros Variables						
Peso Total						
Fresco	² X±DE	3.64 g ± 0.90	3.14 g ± 0.69	3.07 g ± 0.70	3.30 g ± 0.7	2.08 g ± 0.53
	³ Min	2.01 g	2.17 g	2.03 g	2.34 g	1.45 g
	⁴ Max	4.96 g	4.75 g	4.39 g	4.76 g	3.56g
	⁵ Valor P	*7.87x10 ⁻¹	*7.87x10 ⁻¹⁶	*7.87x10 ⁻¹⁶	*7.87x10 ⁻¹⁶	
	⁶ ValorDunnett	1.55	1.05	0.98	1.21	0.42
Seco	X±DE	1.07 g ± 0.12	0.74 g ± 0.11	0.68 ± 0.12	0.64 ± 0.07	0.51 ± 0.08
	Min	0.86 g	0.59 g	0.42 g	0.34 g	0.34 g
	Max	1.28 g	0.95g	0.87 g	0.78 g	0.68 g
	Valor P	*1.66x10 ⁻⁴⁹	*1.66x10 ⁻⁴⁹	*1.66x10 ⁻⁴⁹	*1.66x10 ⁻⁴⁹	
	ValorDunnett	0.55	0.23	0.17	0.12	0.06
Peso Raíz						
Fresco	X±DE	1.42 g ± 0.47	1.93 ± 0.58	1.57 ± 0.20	1.85 ± 0.69	0.78 ± 0.17
	Min	0.71g-	1.24 g-	1.07 g-	1.18 g	0.36 g
	Maxi	2.55 g	2.86 g	1.87g	2.94 g	1.18 g
	Valor P	*2.75 x 10 ⁻²¹	*2.75 x 10 ⁻²¹	*2.75 x 10 ⁻²¹	*2.75 x 10 ⁻²	
	ValorDunnett	0.63	1.14	0.78	1.06	0.27
Seco	X±DE	0.64 g ± 0.10	0.42 ± 0.09	0.14 ± 0.08	0.36 g ± 0.05	0.087 ± 0.10
	Min	0.43 g	0.26 g	0.04 g	0.24 g	0.04 g
	Max	0.81g	0.66 g	0.17 g	0.46 g	0.08g
	Valor P	*5.39 x 10 ⁻⁶⁰	*5.39 x 10 ⁻⁶⁰	*5.39 x 10 ⁻⁶⁰	*5.39 x 10 ⁻⁶⁰	
	ValorDunnett	0.55	0.33	0.05	0.26	0.05
Peso Parte Aérea						
Fresco	X±DE	2.20 g ± 0.56	1.11 g ± 0.50	1.84 g ± 0.65	1.97 g ± 0.66	0.72 ± 0.20
	Min-	3.94 g	0.32 g-	1.07 g	1.09 g	0.38 g
	Max	1.56 g	1.84 g	2.97 g	3.2 g	0.98 g
	Valor P	*2.64 x 10 ⁻²⁶	*2.64 x 10 ⁻²⁶	*2.64 x 10 ⁻²⁶	*2.64 x 10 ⁻²⁶	
	ValorDunnett	1.48	0.40	1.12	1.25	0.31
Seco	X±DE	0.88 g ± 0.39	0.568 ± 0.16	0.53 g ± 0.14	1.97 g ± 0.66	0.16 g ± 0.24
	Min-	0.61g	0.14g	0.31g-	0.18 g	0.054g
	Max	1.00g	0.86g	0.76g	0.62g	0.102g
	Valor P	*6.88x10 ⁻³⁷	*6.88x10 ⁻³⁷	*6.88x10 ⁻³⁷	*6.88x10 ⁻³⁷	
	ValorDunnett	0.71	0.40	0.36	0.27	0.10

¹Control= pinos sin micorrizar.

²X±DE=media y desviación estándar.

³Min = valor mínimo.

⁴Máx=valor máximo.

⁵Valor P= valor de la probabilidad= 0.05.

*Estadísticamente diferente al control. Ver análisis en tablas de anexos.

Además de los parámetros anteriores, se consideró importante analizar los pesos frescos y secos de las plantas, como indicador del desarrollo de las plantas frente a la inoculación (tabla 2).

Se puede observar que las plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 en proporción 1:4 presentaron mayor peso fresco total (3.64 g) seguido de las plantas micorrizadas con *Scleroderma* sp. 167.97 en proporción de 1:8 (3.30 g). Estos pesos superan el valor encontrado en las plantas control (2.08 gr.). Encontrándose diferencia significativa entre los cuatro tratamientos inoculados y las plantas control.

En cuanto al peso seco total de las plantas, los resultados fueron similares a lo referido anteriormente (tabla 2, figuras 6 y 7).

Figura 6. Peso fresco total de las plantas micorrizadas comparadas con el control

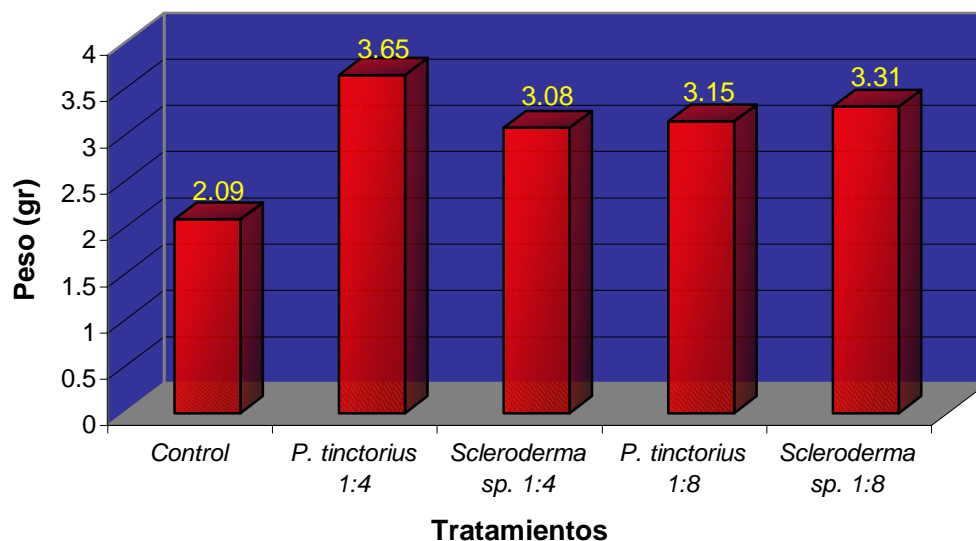
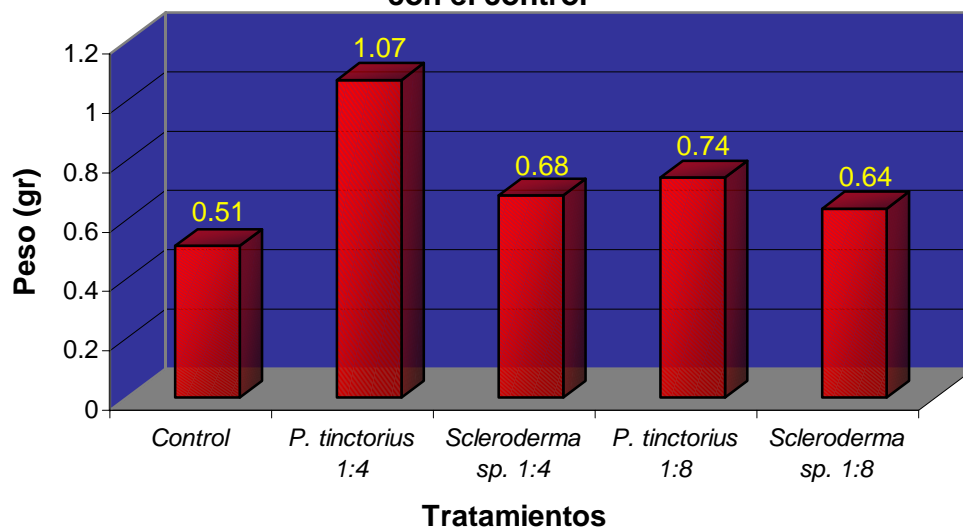


Figura 7. Peso seco total de las plantas micorrizadas comparadas con el control



Respecto al peso fresco y al peso seco de la raíz y de la parte aérea, las plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 presentaron un peso mayor que las plantas control. El análisis estadístico demostró que existe diferencia significativa entre los tratamientos en estos parámetros evaluados (tabla 2, figuras 8 - 11).

Figura 8. Peso fresco de la raíz de las plantas micorrizadas comparadas con el control

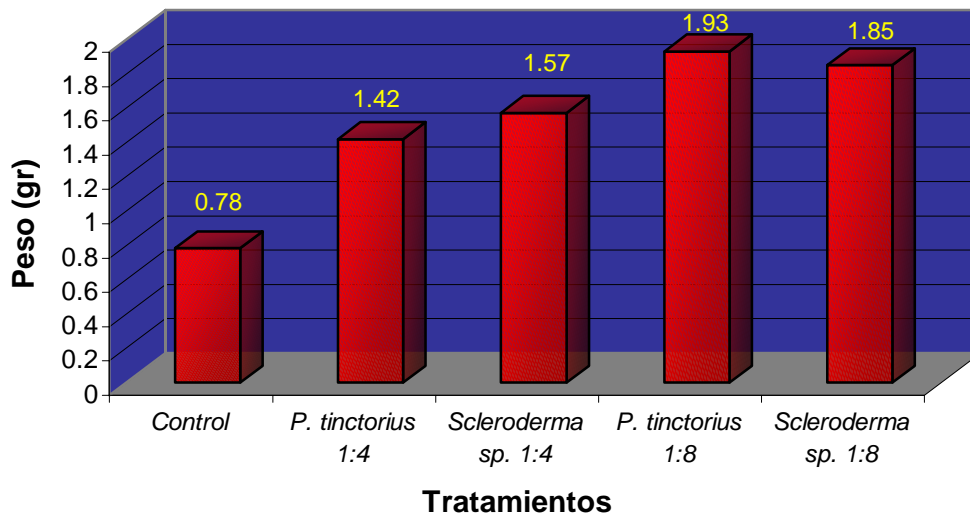


Figura 9. Peso seco de la raíz de las plantas micorrizadas comparadas con el control

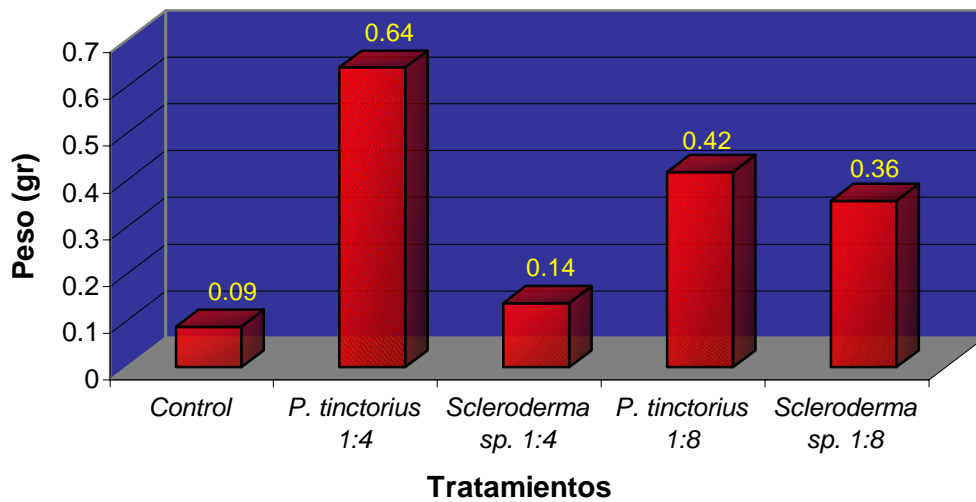


Figura 10. Peso fresco de la parte aérea de las plantas micorrizadas comparadas con el control

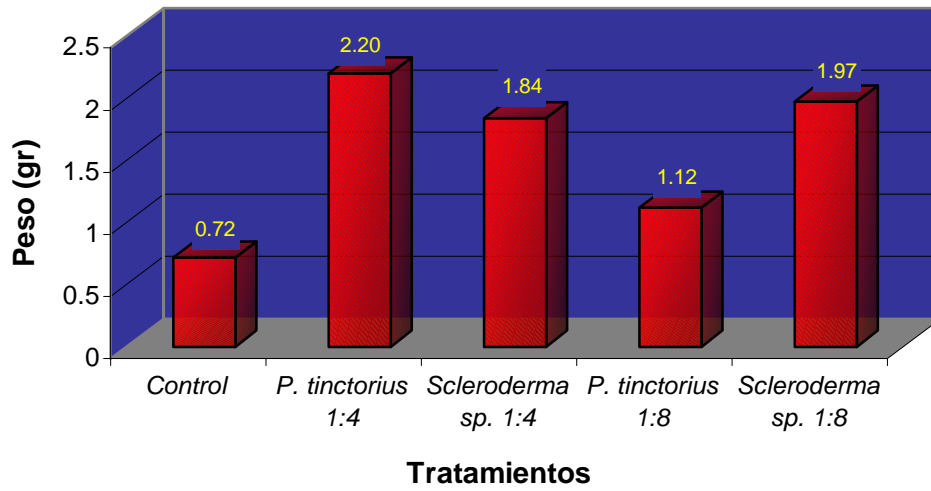
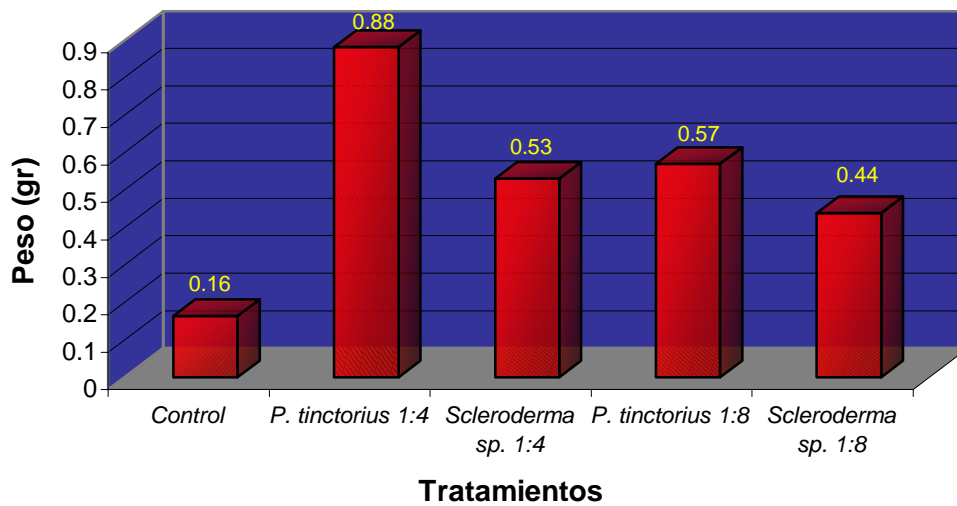


Figura 11. Peso seco de la parte aérea de las plantas micorrizadas comparadas con el control



8.2. Características morfológicas de las micorrizas

8.2.1. *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 + *Pinus caribaea*

Las ectomicorrizas son pequeñas y gruesas de color blanquecino, cuando jóvenes y que después cambian de color beige a café amarillento, con manto grueso, fibroso y compacto. Rizomorfos con longitud entre 1.3 - 2.4 mm y cordones miceliares abundantes de color café amarillento a café claro. Se observan abundantes micorrizas simples a dicotómicas, bifurcadas y estipitadas, de 1.9 – 2.0 mm de longitud total. Cada brazo de las micorrizas presenta una longitud promedio de 0.68 mm y diámetro entre 0.25 – 0.45 mm. El pie de las micorrizas estipitadas tiene una longitud que varía entre 0.40 – 1.0 mm y diámetro entre 0.30 - 0.34 mm. Las hifas poseen un diámetro entre 1.0 – 2.0 μm (foto 5,6).

8.2.2. *Scleroderma* sp. 167.97 + *Pinus caribaea*

Las ectomicorrizas son simples y bifurcadas generalmente, con abundantes cordones miceliares y rizomorfos de apariencia tomentosa. Manto de color beige claro a café pálido en las más maduras y de aspecto fibriloso y compacto en micorrizas jóvenes, el manto puede cubrir la punta de las mismas micorrizas. En micorrizas maduras los cordones y el manto se oscurecen.

Las micorrizas jóvenes miden entre 1.1- 1.45 mm de largo, cada brazo tiene 0.38 mm promedio de longitud y 0.32 mm promedio de diámetro (foto 7,8).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados indican que las cepas nativas *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 de Poptún, departamento de El Petén, utilizadas si son efectivas en la producción de micorrizas y que influyen notoriamente en el desarrollo de las plantas inoculadas, tal como ha sido reportado con otras especies (8,34,60,61).

Uno de los parámetros más importantes que caracteriza el crecimiento y el desarrollo de la planta así como la etapa ideal para el trasplante, permitiéndole mayores garantías de éxito en el campo, es la altura (5). El aumento de altura en plantas micorrizadas está directamente influenciado por el transporte de agua y nutrientes a la planta, así como por la producción de fitohormonas en el sistema micorrícico (4,5,15).

El crecimiento en el diámetro del tallo, es también un buen indicador del desarrollo total de una planta (59). Es notorio que los hongos ectomicorrícicos incrementaron el grosor del tallo de las plantas inoculadas tal como se observa en la tabla 1, incluso se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97.

La medición de esta variable es importante por que se debe asegurar que la planta posea un buen tallo para su sostenimiento y lograr su supervivencia a la hora de trasladarla del invernadero al campo (4).

La longitud que alcance la raíz principal, es otro factor importante en el crecimiento de una planta, ya que es un factor que contribuye a la adaptación a campo definitivo.

Pera (9) menciona que las micorrizas influyen en la elongación radicular, por la producción de metabolitos en la simbiosis micorrícica. Este hecho lo demostró en pruebas de micorrización en cultivo puro (*in vitro*) donde las plantas sin inocular presentaron desarrollo radicular deficiente.

Sin embargo, las raíces principales de *Pinus caribaea* micorrizados con cepas nativas de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 fueron más largas que las de las plantas control, resultado notoriamente diferente al realizado por Pera (9).

La razón de este crecimiento puede ser debido a que las plantas control debieron extender más su sistema radicular para tratar de mejorar la absorción de nutrientes y agua del sustrato.

Otros hallazgos de las pruebas *in vitro* de Pera (9), es que las plantas micorrizadas pueden producir una mayor cantidad de raíces principales, producto de la unión simbiótica.

Sin embargo, en este estudio se encontró que el número de raíces fue mayor en las plantas control al igual que la longitud de la raíz principal, situación que pudo deberse a la necesidad de aumentar el área de absorción, como se mencionó anteriormente.

Determinar el porcentaje de micorrización, es el parámetro más importante para evaluar la capacidad infectiva de las cepas utilizadas y garantizar la sobrevivencia de la planta inoculada al trasplante.

Según los resultados obtenidos, el hongo *Pisolithus tinctorius* 17.07.98, manifestó mayor infectividad respecto a *Scleroderma sp.* 167.97, especialmente en la proporción 1:8 (porcentaje mínimo de micorrización con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 =

75.86% y con *Scleroderma sp.* 167.97 = 60.50%).

El poder de infectividad de dichas especies quedó probado en otro estudio al inocular micelio y esporas en *Pinus maximinoi* (40).

Parladé (12) y Pera (9) indican que la supervivencia de una planta después del trasplante se ve favorecida si la planta posee al menos el 50 % de micorrización.

En las plantas control no se produjeron micorrizas, ni siquiera con contaminantes naturales como *Thelephora* (62).

Por la cantidad de nutrientes absorbidos a través de las micorrizas y metabolitos que se sintetizan en las mismas, las plantas mejoran su desarrollo foliar y radicular, manifestando así un aumento de peso en las mismas (9).

Se determinó que las plantas de *Pinus caribaea* inoculadas y micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma sp.* 167.97 aumentaron notoriamente el peso fresco y seco de sus partes aéreas y radicales frente a las plantas sin inocular.

Las características morfológicas de los dos hongos varían de una especie a otra, *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 / *Pinus caribaea*, presenta micorrizas más largas, más oscuras, predominan las bifurcadas aunque son menos gruesas que las de *Scleroderma sp.* 167.97 / *Pinus caribaea*.

Además de presentar diferencias entre sí, se observa que aún el mismo hongo pero con diferente planta, presenta características propias diferentes, como las obtenidas en el estudio de Urizar con *Pinus maximinoi* (40).

Es importante resaltar que en Guatemala existe una biodiversidad de especies de hongos incluyendo los ectomicorrícicos, razón por la cual se utilizaron cepas que fueran nativas del lugar, con la finalidad de conocer sus características biológicas y

morfológicas y compararlas frente a cepas extranjeras.

Otra razón para ensayar con cepas nativas fue para asegurar su adaptación y resistencia a los factores ambientales del que será su campo definitivo.

X. CONCLUSIONES

- 10.1. Se demostró la capacidad infectiva de una cepa nativa de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y otra de *Scleroderma sp.* 167.97 para formar micorrizas con plantas de *Pinus caribaea*.
- 10.2. Las dosis de inóculo miceliar 1:4 y 1:8 de los hongos estudiados resultaron efectivas ya que produjeron un alto porcentaje de micorrización (75 - 96%).
- 10.3. Se encontró que la proporción de inóculo 1:4 fue más efectiva para *Scleroderma sp.* 167.97 y la proporción 1:8 lo fue para *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 en la producción de micorrizas.
- 10.4. El efecto de las micorrizas en las plantas se manifestó en un aumento considerable en los parámetros de altura, diámetro del tallo, porcentaje de micorrizas, peso fresco total, peso fresco de la parte aérea, peso fresco de la parte radicular, peso seco total, peso seco de la parte aérea y peso seco radicular.
- 10.5. De los parámetros evaluados la longitud de la raíz principal y el número de raíces principales fueron mayores que las plantas control.
- 10.6. Las plantas micorrizadas mostraron en general un mejor crecimiento y desarrollo al compararlas con las plantas sin inocular.
- 10.7. La morfología de las micorrizas observadas fue diferente de una cepa a otra; lo que indica que las micorrizas son únicas y con características propias para cada simbiosis de hongo-planta.

XI. RECOMENDACIONES

- 11.1. Realizar investigaciones sobre el comportamiento de las micorrizas en las plantas de pino a nivel de campo, para determinar su resistencia o cambios sufridos en el sistema micorrícico.
- 11.2. Efectuar estudios de micorrización utilizando esporas de *Scleroderma sp.* y *Pisolithus tinctorius* ya que esto reduciría los costos de producción de planta micorrizada.
- 11.3. Realizar otros estudios con *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma sp.* para la síntesis de micorrizas con otras especies de pino de zonas cálidas (*P. oocarpa*, *P. pseudostrobis*) especialmente zonas semi áridas o deforestadas de Guatemala.
- 11.4. Extender este tipo de investigaciones con otros hongos nativos de El Petén, en los bosques de pino y pino-encino de ese departamento.

XII. REFERENCIAS

- 1.- Pelczar MJ, Reid RD, Chang EC. Microbiología. 4^a. ed. Tay J, trad. México: McGrawHill, 1981. 826 p (p. 268-269).
- 2.- Bonfante P, Giovanetti M. Le Micorrize. Quaderni di Biología 1989;10:46.
- 3.- Servicios Cooperativos de Extensión, Universidad de California y Universidad Estatal de Nebraska, California. Hongos asociados en micorriza benefician el sistema radicular. Agr Amer 1980;1:28-30
- 4.- Arias MJ, Gimeno AM. Micorrización controlada de encinas. Quercus 1994;105:37.
- 5.- Pullido A. Micorrización sencilla para viveros elementales. Quercus 1994;105:34-36.
- 6.- Varma A. Mycorrhiza, structure, function molecular biology and biothecnology. Germany: Springer Verlag. 1992. 730 p.
- 7.- Marx D. El manejo de hongos micorrícicos y la introducción de especies de árboles exóticos. Estados Unidos de América: Depto. de Agricultura, Instituto para el desarrollo y la Investigación Micorrícica, Doc. Tec. 1982. 50 p.
- 8.- Marx D. Mycorrhiza of exotic trees in Peruvian Andes and syntesis of mycorrhiza on mexican pines. Forest Sciences 1975;21:353-358.
- 9.- Pera J. Selección de hongos ectomicorrícicos de *P. pinaster* para su aplicación en reforestación. España: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis doctoral, Facultad de Biología) 1992. 178 p.
- 10.- Trappe JM, Fogel RD. Ecosystematic functions of mycorrhize. p.205-214. (In: Marshall JK. The Belowground ecosystem: a synthesis of plant-associated processes. USA: Colorado State University. Fort Collins Dep. Sci., 1977).
- 11.- Trappe JM, Maser C. Ectomycorrhizal fungi: interactions of mushrooms and truffles

with beast an trees. p.163-179 (In: Walters T. Mushrooms and man: 4th Interdisciplinary approach to mycology. Albany: Linn-Benton Community Col., 1977).

- 12.- Parladé X. Técnicas de Inoculación de Abeto Douglas (*Pseudotsuga menziensis*) con hongos ectomicorrícicos y su aplicación en reforestación. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona, (tesis doctoral, Facultad de Biología) 1992. 202 p.
- 13.- Zaerr JB, Lavender DP. Analysis of plant growth substances in relation to seedling and plant growth. N Z J For Sci 1980;10:186-195.
- 14.- Mikola P. Applications for mycorrhizal symbiosis in forestry practice. p.383-411 (In: Mark GC. Kozlowski TT. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. New York: Academic Press, 1973).
- 15.- Lapeyrie F. The role of ectomycorrhizae in calcareous soil by symbiocalcicole woody plants. Ann Sc For 1985;21:579-589.
- 16.- Wilcox HE. Morphological studies of the root of red pine, *Pinus resinosa*; Growth characteristics an patterns of branching. Am J Boat 1986;1:247-254.
- 17.- Schramm JR. Plant colonization studies on black wastes from anthracite mining in Pennsylvania. Trans Am Philos Soc 1966;56:194.
- 18.- Alvarez IF, Linderman RG. Effects of ethylene and fungicide dips during cold storage on root regeneration and survival of western conifers and their mycorrhizalfungi. Can J For Res 1983;13:962-971.
- 19.-Hermann RK. Growth and production of tree roots. p.7-28. (In: Marshall JK. The belowground ecosystem: a synthesis of plant associated processes. Colorado State: University Fort Collins, 1977).

- 20.- Wilcox HE. Morphological studies of the root of red pine, *Pinus resinosa*. II. Fungal colonization of roots and development of mycorrhizae. *Am J Bot* 1986;55:686-700.
- 21.- Marks GC, Foster RC. Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. p. 1-44 (In: Marks GC, Kozlowski TT. *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. New York: Academic Press, 1973).
- 22.- Abeles FB. *Ethylene in plant biology*. New York: Academic Press 1973; 302 p.
- 23.- Marshall JD. Drought and shade interact to cause fine root mortality in Douglas-fir seedlings. *Plant Soil* 1986;91:51-60.
- 24.- Theodorou C, Bowen GD. Mycorrhizal responses of radiata pine in experiments with different fungi. *Aust For* 1970;34:183-191.
- 25.- Parke JL, Linderman RG, Black CH. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedling. *New Phytol* 1983;95:83-95.
- 26.- Dixon RK, Pallardy SG, Garrett HE, Cox GS. Comparative water relations of container grown and bare-root ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Quercus velutina* seedlings. *Can J Bot* 1983;61:1559-1565.
- 27.- Bowen GD. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. p. 151-205. (In: Marks GC, Kozlowski TT. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. New York: Academic Press, 1973).
- 28.- Hatch AB. The physical basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. *Black Rock For Bull* 1937;6:168.
- 29.- Slankis V. Hormonal relationships in mycorrhiza. p. 231-298 (In: Marks GC, Kozlowski TT. *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*. New York: Academic Press, 1973).

- 30.- Graham JH, Linderman RG. Ethylene production by ectomycorrhizal fungi *Fusarium oxysporum* sp. *pini* and by aseptically synthesized ectomycorrhizae an *Fusarium* infected Douglas-fir roots. Can J Microbiol 1980;26:1340-1347.
- 31.- Rovira AD. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. p. 170-184 (In: Baker KF, Snyder WC. Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. Calif. Press, Berkeley. 1965).
- 32.- Malajczuk N, McComb AJ. Root exudates from *Eucalyptus calophylla* and *Eucalyptus marginata* and their effect on *Phytophthora cinnamomi*. Rands Aust J Bot 1977;25:501-514.
- 33.- Culajay FO. Descripción de las características de cultivo IN VITRO de cepas de hongos ectomicorrícicos aislados en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 76 p.
- 34.- Marx DH. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. p. 13-71. (In: Mikola P. Tropical mycorrhiza research. Oxford Univ: Press, Oxford, 1980).
- 35.- García M. Cultivo de setas y trufas. Madrid: Ed. Mundi Prensa, 1991. 174 p.
- 36.- Cano A, et al. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Monografías. ICONA, 1992;54:44.
- 38.- Vozzo JA, Hacskeylo E. Inoculations of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. Forest Sci 1971;17:239-245.
- 39.- Harley JL, Smith SE. Mycorrhizal symbiosis. London:Academic Press, 1983 ;483.
- 40.- Urizar M. Eficiencia en la producción de micorrizas y aumento de la biomasa en plántulas de pino candelillo (*Pinus maximinoi*) con *Laccaria laccata*, *Pisolithus*

tinctorius y *Scleroderma* sp. en contenedor. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1999. 49 p.

41.- Berduo E. Evaluación de la eficiencia micorrícica de dos cepas de hongos, *Laccaria aff bicolor* y *Suillus aff brevipes*, aisladas en Guatemala, sobre plantas de *Pinus ayacahuite Ehr*, *Pinus rudis* Endl, y *Pinus hartwegii Lindl*. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 2000. 44 p.

42.- Flores R, Bran MC, Rodríguez E, Morales O. Hongos micorrícicos de bosques de pino y pinabete. Guatemala: Dirección General de Investigación, Universidad de San Carlos de Guatemala. Doc. Tec. 2002. 24 p. (p.1-24).

43.- Flores R, Bran M, Berdúo E. Hongos ectomicorrícicos asociados a *Abies guatemalensis*, *Pinus rudis* y *Pinus ayacahuite* en la Sierra de los Cuchumatanes y su aprovechamiento en la producción de planta forestal micorrizada fase III. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación. Doc. Tec. 1999. 23 p. (p.1-23).

44.- Fogel R, Hunt G. Fungal and arboreal biomass in a western Oregon Douglas-fir ecosystem: distribution patterns and turnover. Can J For Res 1979;9:245-256.

45.- Vogt KA, Moore EE, Vogt DJ, Redlin MJ. Conifer fine root and mycorrhizal root biomass within the forest floors of Douglas-fir stands of different ages and site productivities. Can J For Res 1983;13:429-437.

46.- Malajczuk N, Trappe JM, Molina R. Interrelationships among some ectomycorrhizal trees, hypogeous fungi and small mammals: Western Australian and northwestern American parallels. Austr J. Ecol 1987;12: 53-55.

- 47.- Maser Z, Maser C, Trappe JM. Food habits of the northern flying squirrel in Oregon. Can J Zool 1985;63:1085-1088.
- 48.- Ure DC, Maser C. Mycophagy of red-backed voles in Oregon and Washington. Can J Zool 1982;60:3307-3315.
- 49.- Jansen AE, De Nie HW. Relations between mycorrhizas and fruitbodies of mycorrhizal fungi in Douglas fir plantations in The Netherlands. Acta Bot Neerl 1988;37:243-249.
- 50.- Last FT y Fleming LV. Factors affecting the occurrence of fruitbodies of fungi forming sheathing mycorrhizas with roots of tress. Proc Indian Acad Sci 1985;94:111-127.
- 51.- Last FT, Mason PA, Ingleby K, Fleming LV. Succession of fruitbodies of sheathing mycorrhizal fungi associated with *Betula pendula*. For Ecol Manage 1984;9:229-234.
- 52.- Mason PA, Wilson J, Last FT. Mycorrhizal fungi of *Betula spp.*: factors affecting their occurrence. Proc R Soc Edimb 1984; 85:141-151.
- 53.- Lamb A. *Pinus caribaea*. Fast growing, timber trees of the lowland tropics. Oxford University: Depto. of Forestry. Doc. Tec. No. 6, 1978. 254p.
- 54.- Contreras JF. Estudio del crecimiento y rendimiento del *Pinus caribaea morelet*, en Machaquilá, Poptún Petén, Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) 1987. 43 p.
- 55.- Aguilar GJ. Pinus de Guatemala. Museo Nacional de Ciencias Naturales, La Aurora, Guatemala. Doc. Tec. 1971. 33 p.
- 56.- Veillon J. Curso de Ordenación forestal. Turrialba, C:R. II CA, Programa Forestal. 85 p.
- 57.- Daniel T. *et.al.* Principios de Silvicultura. 2ª.ed. Trad. por Ramón Elizondo Mata. México, D.F: McGraw Hill, 1982. 492 p.
- 58.- Lojan L. Tendencias del crecimiento radial de 23 especies forestales. Turrialba

1968;18(3)275-281.

59.- Kornerup A, Wanscher JH. Methuen Handbook of colour. Third edition. London 1,989.

60.- Malajczuk N, Molina R, Trappe JM. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. New Phytol 1982;91:467-482.

61.- Molina R. Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas-fir and lodgepole pine seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. Forest Sci 1979;25:585-590.

62.- Marx D. Mycorrhizae and feeder root diseases. p. 351-382 (En: Marks GC, Kozlowski TT. Ectomycorrhizae: their ecology and physiology. New York: Academic Press).

XIII. ANEXOS

13.1. Preparación del medio Melin-Norkrans Modificado:

Pesar los siguientes reactivos:

Extracto de Malta	3 g.
D-Glucosa	10 g.
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0.25 g.
KH_2PO_4	0.50 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.15 g.
CaCl_2	0.05 g.
FeCl_3 de Sol. al 1%	1.2 mL.
NaCl	0.025 g.
Tiamina-HCl	3 mL
H_2O	1000 mL.

Disolver en agua desmineralizada, llevar a un pH de 6.1- 6.4

**Tabla 3. Análisis estadístico para el parámetro
altura de las plantas**

➤ RESUMEN					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	423.4	14.1133333	1.26395402	
<i>Scleroderma sp</i> ** 1:4	30	333.4	11.1133333	1.49912644	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	439.3	14.6433333	8.71288506	
<i>Scleroderma sp</i> ** 1:8	30	440.5	14.6833333	2.59316092	
Control	40	421.5	10.5375	2.43625	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	549.554021	4	137.388505	42.3348681	5.8329E-24
Dentro de los tratamientos	503.018417	155	3.24528011		
Total	1052.57244	159			
➤ DUNNETT		1.07468564			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		3.57583333			
<i>Scleroderma sp</i> ** 1:4		0.57583333			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		4.10583333			
<i>Scleroderma sp</i> ** 1:8		4.14583333			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 4. Análisis estadístico para el parámetro
diámetro de las plantas**

➤ RESUMEN					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	42	1.4	0.07793103	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	44.6	1.48666667	0.1474023	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	41.4	1.38	0.0582069	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	41.1	1.37	0.03872414	
Control	40	47.72	1.193	0.05503179	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	1.65609083	4	0.41402271	5.58423608	0.0003167
Dentro de los tratamientos	11.4919067	155	0.07414133		
Total	13.1479975	159			
➤ DUNNETT		0.16243722			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		0.207			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		0.29366667			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		0.187			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		0.177			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.98).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 5. Análisis estadístico para el parámetro
longitud de la raíz**

➤ RESUMEN					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	343.5	11.45	6.52741379	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	413.9	13.7966667	1.64102299	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	358.8	11.96	3.3542069	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	334.5	11.15	1.67775862	
Control	40	599.1	14.9775	1.07050641	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	376.958333	4	94.2395833	34.4052352	1.5328E-20
Dentro de los tratamientos	424.561417	155	2.73910591		
Total	801.51975	159			
➤ DUNNETT					
		0.98732416			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		-3.5275			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		-1.18083333			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		-3.0175			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		-3.8275			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

** *Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 7. Análisis estadístico para el parámetro
porcentaje de micorrización**

➤ RESUMEN					
<i>Tratamientos</i>	<i>No. Muestras</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	2229.19	74.3063333	56.1100378	
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:4	30	2132.6	71.0866667	50.3010575	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	2399.04	79.968	194.318203	
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:8	30	2050.32	68.344	15.9050248	
Control	40	0	0	0	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	¹ <i>SC</i>	² <i>GL</i>	³ <i>CM</i>	⁴ <i>F</i>	⁵ <i>P</i>
Entre tratamientos	163988.584	4	40997.1461	692.037033	1.0442E-97
Dentro de los Tratamientos	9182.39536	155	59.2412604		
Total	173170.98	159			
➤ DUNNETT					
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		0			
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:4		0			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		0			
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:8		0			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 8. Análisis estadístico para el parámetro
peso fresco total**

➤ RESUMEN					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	109.433	3.64776667	0.81254743	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	92.333	3.07776667	0.49207308	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	94.452	3.1484	0.48729177	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	99.244	3.30813333	0.50002702	
Control	40	83.5784	2.08946	0.28438265	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	49.4361091	4	12.3590273	24.6998363	7.8781E-16
Dentro de los Tratamientos	77.5571627	155	0.50036879		
Total	126.993272	159			
➤ DUNNETT		0.42198835			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		1.55830667			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		0.98830667			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		1.05894			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		1.21867333			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 9. Análisis estadístico para el parámetro
peso fresco de la parte aérea**

➤ RESUMEN					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	66.0155	2.200516667	0.312978043	
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:4	30	55.199	1.839966667	0.426499068	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	33.522	1.1174	0.254425076	
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:8	30	59.1563	1.971876667	0.439472608	
Control	40	28.6854	0.717135	0.040713457	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	53.73409836	4	13.43352459	48.24847255	2.64343E-26
Dentro de los Tratamientos	43.15569387	155	0.278423831		
Total	96.88979223	159			
➤ DUNNETT					
		0.314781031			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		1.483381667			
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:4		1.122831667			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		0.400265			
<i>Scleroderma sp.**</i> 1:8		1.254741667			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 10. Análisis estadístico para el parámetro
peso fresco de la raíz**

➤ RESUMEN					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	42.605	1.420166667	0.221535937	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	47.165	1.572166667	0.042551385	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	57.9488	1.931626667	0.331128212	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	55.549	1.851633333	0.477829689	
Control	40	31.316	0.7829	0.029428297	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	30.03182034	4	7.507955085	36.06683493	2.75417E-21
Dentro de los Tratamientos	32.26601504	155	0.208167839		
Total	62.29783538	159			
➤ DUNNETT		0.272183734			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		0.637266667			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		0.789266667			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		1.148726667			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		1.068733333			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 11. Análisis estadístico para el parámetro
peso seco total**

➤ RESUMEN					
<i>Tratamientos</i>	<i>No. Muestras</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	32.138	1.071266667	0.015503651	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	20.479	0.682633333	0.013688516	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	22.282	0.742733333	0.01201634	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	19.129	0.637633333	0.00602024	
Control	40	20.486	0.51215	0.006641515	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	5.687692008	4	1.421923002	135.3253866	1.66343 E-49
Dentro de los Tratamientos	1.628652767	155	0.010507437		
Tratamientos					
Total	7.316344775	159			
➤ DUNNETT					
		0.061151027			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		0.559116667			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		0.170483333			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		0.230583333			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		0.125483333			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 12. Análisis estadístico para el parámetro
peso seco de la parte aérea**

➤ RESUMEN					
<i>Tratamientos</i>	<i>No. Muestras</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	26.422	0.880733333	0.01541503	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	15.913	0.530433333	0.01972253	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	17.061	0.5687	0.025647252	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	13.118	0.437266667	0.01546634	
Control	40	6.522	0.16305	0.056231844	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	9.1717806	4	2.29294515	80.69487925	6.88288E-37
Dentro de los Tratamientos	4.4043253	155	0.028415002		
Total	13.5761059	159			
➤ DUNNETT					
		0.10056091			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		0.717683333			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		0.367383333			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		0.40565			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		0.274216667			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.

**Tabla 13. Análisis estadístico para el parámetro
peso seco de la raíz**

➤ Resumen					
Tratamientos	No. Muestras	Suma	Promedio	Varianza	
<i>P. tinctorius</i> * 1:4	30	19.245	0.6415	0.01063819	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4	30	4.117	0.137233333	0.007608254	
<i>P. tinctorius</i> * 1:8	30	12.523	0.417433333	0.00909053	
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8	30	10.678	0.355933333	0.002106064	
Control	40	3.4801	0.0870025	0.010975247	
➤ ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	¹ SC	² GL	³ CM	⁴ F	⁵ P
Entre tratamientos	6.58965919	4	1.647414798	199.1986347	5.39953E-60
Dentro de los Tratamientos	1.28188275	155	0.008270211		
Total	7.87154194	159			
➤ DUNNETT					
		0.054251738			
<i>P. tinctorius</i> * 1:4		0.5544975			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:4		0.050230833			
<i>P. tinctorius</i> * 1:8		0.330430833			
<i>Scleroderma sp.</i> ** 1:8		0.268930833			

**Pisolithus tinctorius* (17.07.98).

***Scleroderma sp.* (167.97).

¹SC=suma de cuadrados.

²GL=grados de libertad.

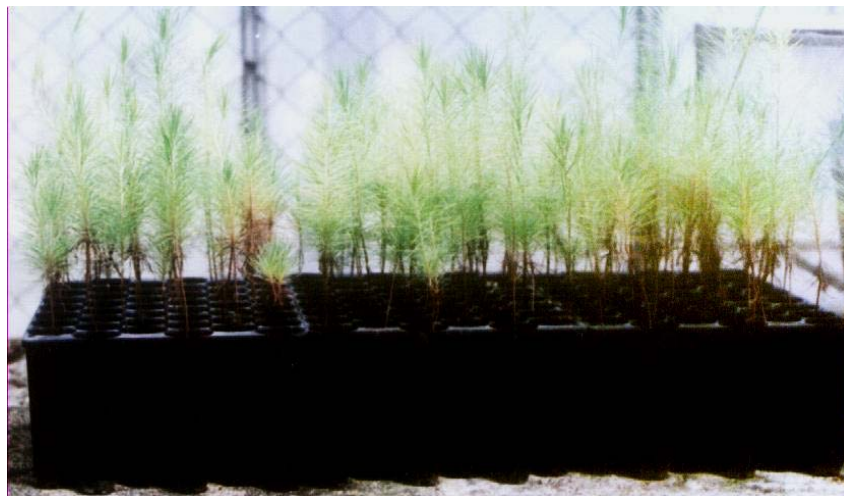
³CM=cuadrado de medias.

⁴F=frecuencia.

⁵P=probabilidad.



Fotografía 1: Cuerpos fructíferos de *Scleroderma* sp. 167.97 colectados de bosques de *Pinus caribaea* en Poptún-Petén.



Fotografía 2: Plantas de cuatro meses de desarrollo de

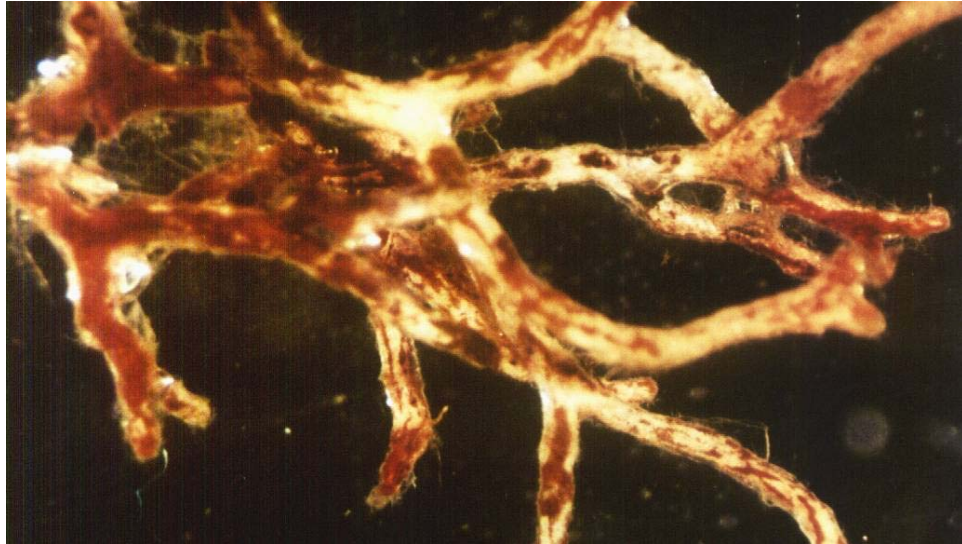
Pinus caribaea inoculadas con micelio de *Pisolithus tinctorius* 17.07.98 y *Scleroderma* sp. 167.97 en contenedor en condiciones de invernadero.



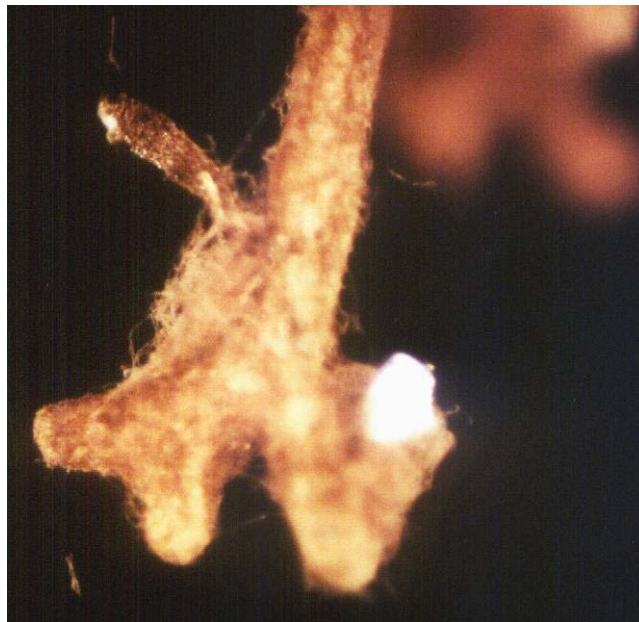
Fotografía 3: Planta de seis meses de desarrollo de *Pinus caribaea* micorrizada con *Scleroderma* sp. 167.97



Fotografía 4: Raíces de *Pinus caribaea* micorrizadas con *Scleroderma sp* 167.97
Obsérvese como cubre el micelio a la raíz.

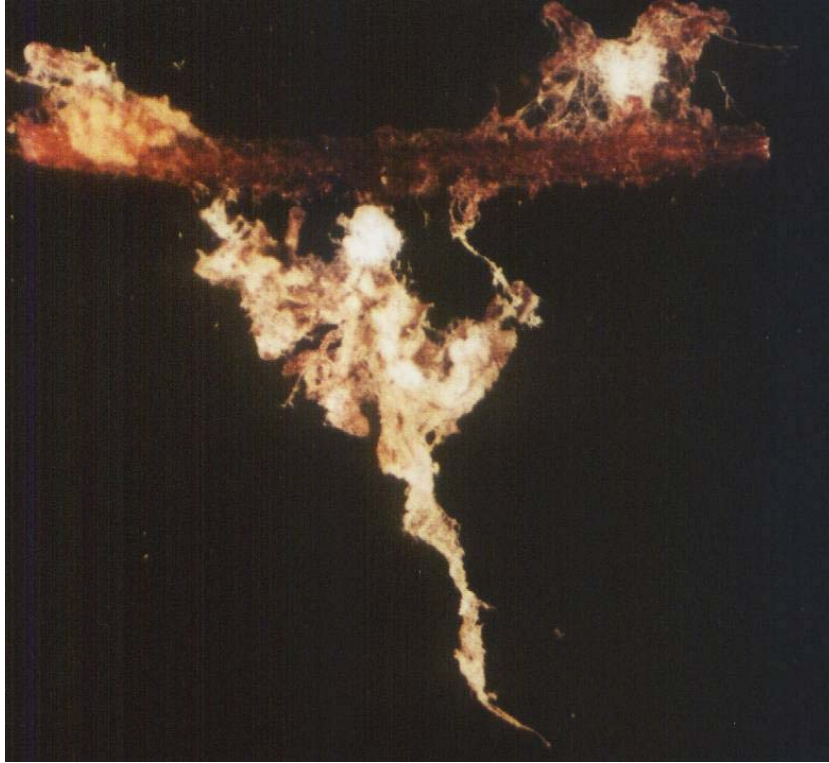


Fotografía 5: Raíces de *Pinus caribaea* micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* 17.07.98, observadas con microscopio estereoscópico con aumento 4 X.

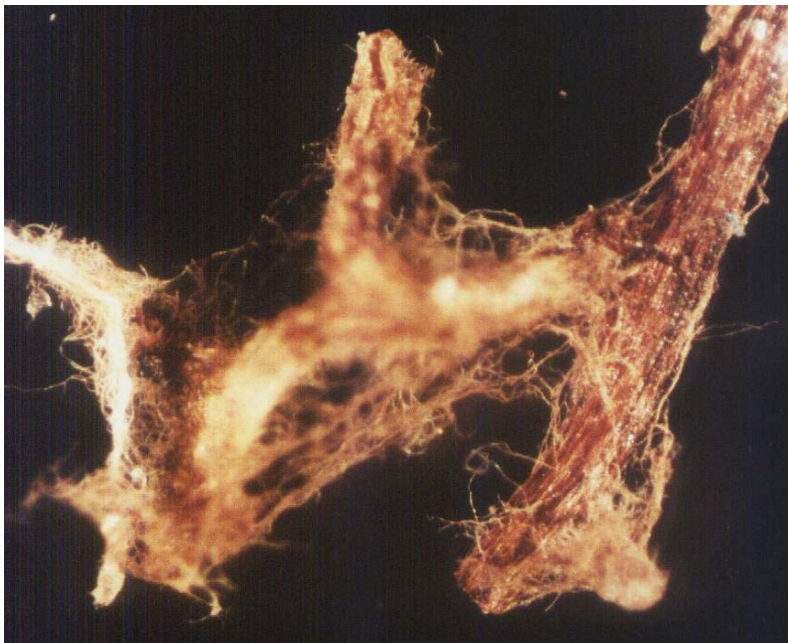


Fotografía 6: Detalle de la micorriza de

Pinus caribaea inoculada con
Pisolithus tinctorius 17.07.98, observadas
con microscopio estereoscópico con aumento
10 X.



Fotografía 7: Raíces de *Pinus caribaea* micorrizadas
con *Scleroderma* sp. 167.97, observadas con microscopio
estereoscópico con aumento 4 X.



Fotografía 8: Detalle de la micorriza de *Pinus caribaea*
Inoculada con *Scleroderma* sp. 167.97, observadas
con microscopio estereoscópico con aumento 10 X.

Br. Martha Lydia Reyes Salazar

AUTOR

Dr. Roberto Flores Arzú

ASESOR

Lic. Osberth Morales Esquivel

CO-ASESOR

Licda. Alba Marina Valdés de García

DIRECTORA

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

DECANO