

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESTUDIOS SOBRE LA EFICIENCIA DE LA SIMBIOSIS MICORRÍTICA  
EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *EUCALYPTUS GRANDIS*

Por

Ana Cecilia AGUILAR ALONSO

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo.  
(Orientación Forestal)

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
1999

Tesis aprobada por:

Director:

FRONI LILIAN

Nombre completo y firma

MALVAREZ GABRIELA

Nombre completo y firma

KRAUSE MONICA

Nombre completo y firma

Fecha:

\_\_\_\_\_

Autor:

\_\_\_\_\_

Nombre completo y firma

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a la Licenciada en Ciencias Biológicas Gabriela Malvárez de la Cátedra de Microbiología por su tiempo dedicado en dicho trabajo.

A Wilfredo Ibáñez, de la Unidad de la Unidad de Estadística y Cómputo.

A Sebastián Marquisá por su valioso apoyo.

A Daniel Lorenzo por su aporte en la realización de este trabajo.

Por último agradezco a todas aquellas personas que de una forma u otra y en distintas etapas de la tesis me brindaron su apoyo y colaboración.

# TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	IV

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
------------------------------	----------

<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
--	----------

2.1 CONCEPTOS GENERALES DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO FORESTAL .....	4
--	---

2.1.1- <i>Antecedentes históricos</i> .....	4
---	---

2.1.2- <i>Definiciones</i> .....	4
----------------------------------	---

2.1.3- <i>Fundamentos de un programa de mejoramiento genético forestal</i> .....	5
--	---

2.1.4- <i>Objetivos del mejoramiento genético</i> .....	5
---	---

2.1.5- <i>Ventajas y limitaciones del mejoramiento genético forestal</i> .....	6
--	---

2.1.6- <i>Aspectos cuantitativos del mejoramiento genético forestal</i> .....	6
---	---

2.2 IMPORTANCIA DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN LAS ESPECIES FORESTALES .....	7
---	---

2.2.1- <i>Usos de la propagación vegetativa</i> .....	8
---	---

2.2.2- <i>Ventajas y desventajas de la propagación vegetativa</i> .....	8
---	---

2.2.3- <i>Técnicas de propagación vegetativa</i> .....	10
--	----

2.2.3.1- <i>Definiciones</i> .....	10
------------------------------------	----

2.2.3.2- <i>Injerto</i> .....	10
-------------------------------	----

2.2.3.3- <i>Estacado</i> .....	10
--------------------------------	----

2.2.3.4- <i>Acodos</i> .....	11
------------------------------	----

2.2.3.5- <i>Fascículos aciculares</i> .....	11
---	----

2.2.3.6- <i>Propagación in vitro</i> .....	11
--	----

2.2.3.6.1- <i>Propagación clonal por microestaquilla</i> .....	12
--	----

2.2.3.6.2- <i>Micropropagación</i> .....	12
--	----

2.3- BIOTECNOLOGÍA EN EL DESARROLLO FORESTAL .....	13
--	----

2.4- MICROPROPAGACIÓN .....	14
-----------------------------	----

2.4.1- <i>Consideraciones generales</i> .....	14
---	----

2.4.2- <i>Antecedentes</i> .....	15
----------------------------------	----

2.4.2.1- <i>Micropropagación en Eucalyptus</i> .....	15
--	----

2.4.3- <i>Ventajas y desventajas de la micropropagación</i> .....	17
---	----

2.4.4- <i>Técnicas de micropropagación</i> .....	17
--	----

2.4.5- <i>Especies de Eucalyptus utilizadas en la micropropagación</i> .....	20
--	----

2.4.6- <i>Etapas de la micropropagación</i> .....	20
---	----

2.5- LAS MICORRIZAS .....	22
---------------------------	----

2.5.1- <i>Definición</i> .....	22
--------------------------------	----

2.5.2- <i>Tipos de micorrizas</i> .....	23
---	----

2.5.2.1- <i>Las ectomicorrizas</i> .....	23
--	----

2.5.2.2- <i>Las endomicorrizas (VAM)</i> .....	24
--	----

2.5.3- <i>Micorrizas en Eucalyptus</i> .....	25
--	----

2.5.3.1- <i>Estructura de las micorrizas en Eucalyptus</i> .....	25
--	----

2.5.3.2- <i>Hongos micorrízicos en Eucalyptus</i> .....	26
---	----

2.5.4- <i>Proceso de infección</i> .....	26
--	----

2.5.5- <i>Beneficios de la simbiosis micorrízica</i> .....	28
--	----

2.5.5.1- <i>Beneficios para el hongo</i> .....	28
--	----

2.5.5.2- <i>Beneficios para la planta</i> .....	29
---	----

2.5.5.3- <i>La simbiosis en la nutrición mineral</i> .....	30
--	----

2.5.5.3.1- Nutrición fosforada .....	30
2.5.5.3.2- Nutrición nitrogenada: .....	32
2.5.5.3.3- Otros nutrientes: .....	32
<u>2.5.6- Factores que afectan la simbiosis micorrítica</u> .....	33
<u>2.5.7- Producción de inóculo y técnicas de inoculación</u> .....	37
2.5.7.1- Producción de inóculo ectomicorrítico .....	38
2.5.7.2-Producción de inóculo endomicorrítico .....	41
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
3.1- MATERIAL VEGETAL Y MÉTODO DE PROPAGACIÓN .....	43
3.2- FUENTES DE INÓCULO .....	43
3.3- TRANSPLANTE Y DISEÑO DE INOCULACIÓN .....	44
3.4- EVALUACIÓN .....	45
3.5- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MICORRIZACIÓN .....	46
3.6- EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS .....	47
3.7- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS SUSTRATOS .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
4.1- MATERIAL VEGETAL .....	48
4.2-DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN .....	49
<u>4.2.1-Primera evaluación del ensayo I</u> .....	49
<u>4.2.2-Segunda evaluación del ensayo I</u> .....	50
<u>4.2.3-Evaluación del ensayo II</u> .....	51
4.3-EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS .....	55
<u>4.3.1-Peso de las plantas</u> .....	55
4.3.1.1- Primera evaluación del ensayo I .....	55
4.3.1.2- Segunda evaluación del ensayo I .....	57
4.3.1.3-Evaluación del ensayo II .....	57
4.3.1.4-Análisis estadístico .....	58
<u>4.3.2-Alturas de las plantas</u> .....	59
<u>4.4-Análisis químico del sustrato</u> .....	64
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
5.1-PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN .....	65
5.2-CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS .....	68
<u>5.2.1-Pesos de las plantas</u> .....	68
<u>5.2.2-Alturas de las plantas</u> .....	70
<u>5.2.3-Supervivencia de las plantas</u> .....	70
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>7.RESUMEN</b> .....	<b>73</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>74</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>75</b>
<b>10. ANEXO</b> .....	<b>83</b>

## **LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Porcentajes promedios de micorrización al mes de trasplante (ensayo I)	49
2	Análisis estadístico de los resultados de micorrización, al mes de trasplante, del ensayo I (alfa 0.05)	49
3	Porcentajes promedios de la segunda evaluación, a cuatro meses y medio del trasplante (ensayo I)	50
4	Porcentajes promedios de la segunda evaluación, a cuatro meses y medio del trasplante (ensayo II)	51
5	Análisis estadístico del porcentaje de micorrización (alfa 0.05)	52
6	Pesos promedios en la primera evaluación, al mes de trasplante (ensayo I)	55
7	Análisis estadístico de los pesos en la primera evaluación del ensayo I, al mes de trasplante (alfa 0.05)	56
8	Pesos promedios a los cuatro meses y medio del trasplante (ensayo I)	57
9	Pesos promedios a los cuatro meses y medio del trasplante (ensayo II)	57
10	Análisis estadístico de los pesos a los cuatro meses y medio del trasplante (ambos ensayos) (alfa 0.05)	58
11	Evolución de las alturas de la parte aérea en ambos ensayos	59
12	Porcentaje de supervivencia en la evaluación final (ensayo I)	63
13	Porcentaje de supervivencia en la evaluación final (ensayo II)	63
14	Análisis químico del sustrato del primer ensayo	64
15	Análisis químico del sustrato del segundo ensayo	64
<b>Gráfica</b>		<b>Página</b>
1	Porcentaje de micorrización del ensayo I (al mes de trasplante)	50
2	Porcentaje de micorrización en los ensayos I y II (a los cuatro meses y medio del trasplante)	51
3	Evaluación de peso seco del ensayo I (al mes del trasplante)	56
4	Evaluación de peso seco de los ensayos I y II (a cuatro meses y medio del trasplante)	58
5	Evolución de alturas (ambos ensayos)	60
<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Métodos principales de micropropagación	18

Foto		Página
1	Explantos del clon BS de <i>Eucalyptus grandis</i> al momento del trasplante	48
2	Raíz del clon BS de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizada por <i>Pisolithus tinctorius</i> (1.2 x)	53
3	Raíz del clon BS de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizada por <i>Pisolithus tinctorius</i> , con mayor aumento (3x)	53
4	Raíz del clon BS de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizada por <i>Cenococcum graniforme</i> (1.5 x)	54
5	Raíz del clon BS de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizada por <i>Cenococcum graniforme</i> (1.4 x)	54
6	Raíz del clon BS de <i>Eucalyptus grandis</i> colonizada por <i>Pisolithus tinctorius</i> (1.5 x)	55
7	Altura de plantas micropropagadas de <i>Eucalyptus grandis</i> al mes de trasplante	61
8	Altura de plantas micropropagadas de <i>Eucalyptus grandis</i> a los cuatro meses y medio del trasplante	62

## 1.INTRODUCCIÓN

La actividad forestal ha cobrado en los últimos años una gran dinámica en el Uruguay. El área de plantaciones alcanza aproximadamente 400 000 hectáreas (agosto 1997), principalmente de eucaliptos de las especies de *E.grandis*, *E.globulus*, *E.dunnii*, *E.viminalis*.

Por sus ventajas naturales, política forestal y ubicación estratégica, Uruguay puede proveer de madera aserrada de alta calidad, a mercados como Europa y América del Norte, así como de madera aserrada de menor calidad para pallets, madera rolliza, chips y pulpa para el sector papelerero.

El género *Eucalyptus* ofrece muchas posibilidades para la explotación forestal, presentando diversas especies y orígenes adaptables a las más variadas condiciones ambientales. Además los eucaliptos son de rápido crecimiento y poseen madera densa, posibilitando una amplia gama de productos de interés.

Los desafíos de hoy en día son la generación de conocimientos y tecnologías que permitan aumentar el nivel productivo así como la calidad de las plantaciones de *Eucalyptus*.

La variabilidad intra e interespecífica observada en este género es importante en características como tasa de crecimiento, resistencia a heladas, enfermedades y déficit hídrico, entre otras. En este sentido, el cultivo de clones ha abierto puertas para la conservación de genotipos de interés, el rejuvenecimiento fisiológico de viejos rebrotes y la rápida multiplicación de individuos deseables para la propagación masiva a escala comercial. La micropropagación es una técnica que permite la multiplicación de genotipos selectos.

Una causa muy común de pérdidas de plantas micropropagadas es el problema de adaptación de las mismas a las condiciones ambientales naturales. La etapa de aclimatación es muy importante y determina el éxito de la producción.

El control de las condiciones ambientales luego del trasplante, así como el uso de sustratos ricos en nutrientes o fertilizaciones regulares trata en cierta medida de sobrellevar estas pérdidas.

Un programa de micorrización representa una alternativa para el uso de fertilizantes. Uruguay no ha desarrollado aún un programa de micorrización para eucaliptos debido a la falta de investigación en esta área.

Las especies del género *Eucalyptus* forman dos tipos de micorrizas principalmente, con hongos endo y ectomicorríticos. Estudios recientes han determinado la presencia de una sucesión endo-ectomicorrítica en función de la edad de la planta. Estas y otras observaciones conducen a la necesidad de mayores estudios para determinar la mejor estrategia de inoculación. Muchos autores confirman la importancia de seleccionar

hongos compatibles con la especie del árbol en estudio y adaptarlos a las condiciones locales.

Desde 1992, el Laboratorio de Biotecnología junto con la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Agronomía viene desarrollando estudios sobre micorrizas en *Eucalyptus*. Así mismo en el Laboratorio de Biotecnología se desarrollan trabajos sobre micropropagación de *E.grandis* y en la Cátedra de Microbiología se aíslan hongos ectomicorríticos de diferentes plantaciones del país y se obtiene la síntesis de micorrizas *in vitro*.

La inoculación micorrítica permite obtener una mayor eficiencia radicular y un efecto positivo en la absorción de fósforo debido a que si bien los hongos micorríticos no solubilizan en forma directa las fuentes de fósforo insolubles en el suelo, realizan una estimulación indirecta de la transformación química a formas solubles. Una colonización de hongos micorríticos resulta en un crecimiento mayor de las plantas (Delorenzini, 1982). Al trabajar con plantas genéticamente iguales (micropropagadas) se eliminaría esta fuente de variabilidad. En consecuencia las diferentes respuestas obtenidas se deberán a los diferentes tratamientos practicados.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de la micorrización de plantas micropropagadas del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* inoculadas con hongos ectomicorríticos y endomicorríticos en forma separada y en forma conjunta. También se evaluaron posibles incrementos en el éxito del trasplante de las mismas al ser inoculadas.

## 2.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONCEPTOS GENERALES DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO FORESTAL.

#### 2.1.1- Antecedentes históricos

Antiguamente la variabilidad genética de los árboles fue ignorada y, de una manera u otra, se tenía la idea de que el desarrollo de los mismos dependía del ambiente en el cual crecían. Una vez que se aceptó que el origen paterno de los árboles forestales era importante y que las mejoras en el crecimiento y calidad de los árboles se lograrían por medio de cruza y control de los padres, se comenzó a considerar programas de mejoramiento genético a escala práctica (Zobel y Talbert, 1992).

Si bien se cuentan con trabajos sobre genética forestal desde principios del siglo XVIII, los primeros artículos de un programa genético forestal datan de la década de los 50's del siglo XX.

El éxito de los primeros programas de mejoramiento genético se debió, fundamentalmente, a la inclusión del peso específico de la madera como variable de importancia, si bien poco se sabía acerca de su heredabilidad. Esta característica está bajo un fuerte control genético y afecta el rendimiento y la calidad de los productos de la madera (Zobel y Talbert, 1992).

#### 2.1.2- Definiciones

Según Zobel y Talbert (1992), hay que distinguir tres términos dentro de lo que es mejoramiento genético forestal:

La **genética forestal** tiene como objetivo determinar las relaciones genéticas existentes entre los árboles y las especies. La **genotecnia forestal** está enfocada a la solución de un problema específico o la producción de un producto deseado (por ejemplo líneas de árboles resistentes a una plaga, a las heladas, etc.). Finalmente el término **mejoramiento genético forestal** se aplica cuando el control de las fuerzas parentales se combina con prácticas culturales.

En definitiva, el mejoramiento genético forestal es el vínculo de la Silvicultura y el origen de los árboles para obtener los productos más redituables en el menor tiempo posible.

La tarea de un mejorador genético es ser capaz de reconocer la variabilidad natural, aislarla, reunirla en un ejemplar deseado y multiplicarla. A medida que se obtienen resultados y se desarrollan nuevas generaciones es necesario ir perfeccionando las técnicas para mantener y aumentar la variabilidad.

### **2.1.3- Fundamentos de un programa de mejoramiento genético forestal**

En la actualidad, el mayor factor limitante de los altos rendimientos forestales se debe al potencial genético. Pero en la medida en que se logren líneas genéticamente mejoradas, los factores ambientales pasarán a un primer plano.

No es de esperar grandes ganancias solamente con el uso de la genética, si no se corrigen antes las limitantes ambientales, como exceso o falta de humedad, heladas, etc.

El técnico forestal puede reducir las limitantes ambientales mediante prácticas silviculturales. Sin embargo, en la medida en que las plantaciones sean desplazadas hacia suelos degradados o de menor calidad se hace imperiosa la creación de líneas de árboles capaces de superar dichas limitantes.

Zobel y Talbert (1992) citan trabajos en los cuales ha sido posible, mediante mejoramiento genético, superar limitantes ambientales tales como sequía (Brix, 1959; Bey, 1974), exceso de agua (Zobel, 1959; Hosner y Boyce, 1962; Heth y Kramer, 1975), o al frío (Dietrichson, 1961; Parker, 1963; Sakai y Okada, 1971).

Hay que tener en cuenta qué factores económicos pueden incidir en la decisión de la implementación un mejoramiento genético o de un programa de acciones correctivas de las limitantes (por ejemplo el uso de fertilizantes, u otros).

Existen dos aspectos a considerar en cualquier programa de mejoramiento genético. Uno, es la producción de grandes cantidades de semilla homogéneas sincronizadas con las operaciones forestales. La falta de semilla adecuada es una de las limitantes en dasonomía. Las ganancias máximas se logran utilizando algunos de los mejores progenitores (desde el punto de vista genético) con el fin de obtener grandes cantidades de material de siembra mejorado.

El segundo aspecto está relacionado con la necesidad de obtener una amplia base genética vital para continuar el progreso del programa al cabo de muchas generaciones (Zobel y Talbert, 1992).

### **2.1.4- Objetivos del mejoramiento genético**

El objetivo principal de un programa de mejoramiento genético es obtener árboles que estén más cerca de la condición deseada que aquéllos que se utilizan comúnmente.

Los métodos utilizados para provocar los cambios en los árboles varían según las características deseadas. Cuando la propagación vegetativa es posible, las ganancias pueden ser mayores, pero de todas formas algunas de las características deseables de los progenitores no se obtienen en las progenies debido a la interacción genotipo-ambiente.

Las ganancias del mejoramiento genético empiezan a disminuir a medida que aumentan los esfuerzos y llegan al punto donde producen una menor cantidad de mejoramiento por unidad de esfuerzo (Zobel y Talbert, 1992).

### **2.1.5- Ventajas y limitaciones del mejoramiento genético forestal**

Una de las principales ventajas del mejoramiento genético forestal es la cualidad de permanencia de una mejora por varias generaciones. Esto tiene gran importancia económica, aún cuando el costo inicial de obtención de los árboles sea alto.

Otra de las ventajas es el mantenimiento del material mejorado por medio de propagación vegetativa.

Finalmente, el hecho de que la mayoría de los rodales forestales muestren gran variabilidad genética y que no hayan sufrido cambios importantes por acción del hombre, ofrece al mejorador muchas oportunidades de hacer mejoramientos.

Sin embargo existen una serie de dificultades asociadas con estas plantas de gran longevidad. Por un lado, el tamaño de los árboles dificulta la cosecha de las semillas. Por otro lado, se debe encontrar áreas adecuadas para almacenar el material genético y para hacer las pruebas.

Asimismo, muchas especies de árboles no florecen a edad temprana, lo que enlentece el programa de mejoramiento.

La disponibilidad de semilla con características genéticas conocidas o deseadas es un problema frecuente.

También existen otros tipos de problemas, más allá del aspecto biológico. La falta de conocimiento de lo que se requerirá en el futuro, es una traba muy importante. Es necesario saber en la actualidad qué característica será de importancia económica a largo plazo. Esto obliga a tomar precauciones en la toma de decisiones del mejorador.

Otros grandes problemas son la capacidad de los investigadores forestales frente a cambios radicales y la permanencia del apoyo de las organizaciones forestales.

### **2.1.6- Aspectos cuantitativos del mejoramiento genético forestal**

El comportamiento de un árbol está determinado por la varianza genética aditiva (transmitida sexualmente), la varianza genética no aditiva (no se transmite sexualmente), la varianza ambiental y la varianza genotipo ambiente (Zobel y Talbert, 1992).

Si se conoce con anterioridad que el carácter que se pretende mejorar posee una gran proporción de varianza genética aditiva, la propagación por vía sexual puede ser la estrategia adecuada; pero si la mayor proporción la constituye el componente no aditivo, es mejor usar la vía asexual (Carpinetti, 1996).

Un concepto fundamental a tener en cuenta en el mejoramiento genético es el de la **heredabilidad**. Los valores de heredabilidad expresan la proporción de la variación en la población que es atribuible a diferencias genéticas entre los individuos. Es decir, indica el grado de transmisión de las características de los progenitores a sus descendientes. No hay que olvidar que las estimaciones de la heredabilidad sólo se

aplican a una población particular que crece en un ambiente particular y en un período particular (Zobel y Talbert, 1992).

Existe una gran variación en el grado al cual las características están bajo control genético aditivo. Características como peso específico de la madera están genéticamente controladas sin importar la especie, no obstante, el crecimiento en altura tiene un control más débil y es afectada por cambios ambientales.

## **2.2 IMPORTANCIA DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN LAS ESPECIES FORESTALES.**

El uso de la propagación vegetativa está en aumento y es de vital importancia para el mejoramiento genético forestal. Si bien hasta el momento se la ha utilizado solo para preservar genotipos en bancos clonales y establecer huertos semilleros, actualmente se ha comenzado a implementar la propagación vegetativa en programas operativos de plantación (Zobel y Talbert, 1992).

La propagación vegetativa se utiliza en especies de los géneros *Populus*, *Salix*, *Eucalyptus*, *Cryptomeria*, *Sequoia*, *Picea*, entre otras (Zobel y Talbert, 1992). El mayor problema radica en la falta de programas de mejoramiento genético para producir mejores árboles destinados a un programa de regeneración vegetativa.

En muchos casos, sólo se seleccionan ejemplares dentro de rodales o bien se producen híbridos  $F_1$  a partir de los cuales se eligen los genotipos superiores. Los híbridos son por lo general sólo un poco mejores que los progenitores utilizados, por lo que para obtener ganancias a largo término si se van a usar híbridos en programas de mejoramiento genético forestal mediante el método de propagación vegetativa, es necesario un programa de genética que mejore los progenitores antes de obtener nuevos híbridos (Zobel y Talbert, 1992).

El uso de propágulos vegetativos tiene vital importancia en dasonomía. Si se desea cierta clase de madera, o cierta característica, es posible obtenerla mediante la propagación vegetativa.

Las especies del género *Eucalyptus* presentan rápido crecimiento y poseen una madera densa que las hace muy atractivas para el sector productivo forestal.

Debido a la gran variabilidad intra e interespecífica en características de interés, la propagación vegetativa brinda una serie de ventajas con relación a la propagación por semilla, posibilitando la transmisión de importantes caracteres que, por su baja heredabilidad, no se transmiten eficazmente a la progenie por vía sexual (Ipinza y Gutiérrez, 1992, citado por Aldabalde et al, 1997).

### **2.2.1- Usos de la propagación vegetativa**

Los usos de la propagación vegetativa pueden resumirse de la forma siguiente:

- Preservación de genotipos mediante el uso de bancos clonales.
- Multiplicación de genotipos convenientes para usos especiales, tales como huertos semilleros o huertos de investigación.
- Evaluación de los genotipos y su interacción con el ambiente a través de pruebas clonales.
- Obtención de máximas ganancias genéticas al utilizarla para regeneración en programas operativos de plantación.

### **2.2.2- Ventajas y desventajas de la propagación vegetativa**

Dentro de las ventajas se pueden citar:

1. Potencial para obtener mayores ganancias genéticas. Cuando se utiliza la regeneración a partir de semilla, sólo la porción aditiva de la variación genética puede ser manipulada por el genetista. Para algunas características, con pocas cantidades de varianza no aditiva, las ganancias obtenidas mediante el uso de regeneración por semilla serán grandes pero, para otras como el crecimiento, las ganancias serán pocas (Zobel y Talbert, 1992).
2. El uso de la propagación vegetativa permite captar y transferir al nuevo árbol todo el potencial genético del árbol donador (Zobel y Talbert, 1992).
3. Potencial para obtener una uniformidad en la cosecha de los árboles mayor que la que es posible a través de la regeneración por semilla. Esta característica permite además una mayor eficiencia en la cosecha, lo que se traduce en un aumento productivo y en una disminución en los costos operativos (Aldabalde et al, 1997).
4. Bajo ciertas condiciones, la oportunidad de acelerar los resultados de las actividades del mejoramiento genético forestal. En el caso de características como el crecimiento en volumen que tienen heredabilidades bajas, en sentido estricto, parece posible obtener a corto plazo, en muchas especies, más del doble de ganancia genética utilizando propágulos vegetativos (Zobel y Talbert, 1992).
5. El uso de tecnologías de cultivo *in vitro*, está asociado al proceso de transformación genética. Un ejemplo es el caso de obtención de *Eucalyptus* con resistencia a

herbicidas, resistencia al frío y madera con menor contenido de lignina (Purse, 1993, citado por Carpineti, 1996).

6. Utilizando clones de alta productividad es posible mejorar la eficiencia en el uso de la tierra, ya que se puede acortar el turno de corta (Carpineti, 1996). También se logra una mejor adaptación al sitio específico, teniendo los clones de *E.grandis* una alta afinidad con sitios determinados, lo que evidencia una fuerte interacción genotipo ambiente (Aldabalde et al, 1997).

Las principales desventajas son:

1. Se requiere un conocimiento técnico especializado y un entrenamiento específico de todo el proceso. La optimización del uso de las infraestructuras lleva a una producción masiva durante todo el año. En consecuencia, se cuenta con material propagado en épocas del año no aptas para la plantación siendo el mismo utilizado en estado avanzado de producción (Assis, 1996).
2. El costo de producción de los propágulos vegetativos es mayor que en la producción por semilla. En la medida que se obtengan mayores ganancias genéticas este aspecto se verá compensado (Assis, 1996).
3. Existe una mayor interacción genotipo ambiente, lo que hace fundamental establecer los sitios más adecuados para cada clon (Zobel y Talbert, 1992).
4. Si bien algunos forestales afirman que los miembros de un clon se adaptan a un rango estrecho de condiciones ambientales, cada genotipo individual puede poseer una capacidad considerable de adaptarse a diferentes plagas o ambientes adversos. Pueden seleccionarse clones que posean una mayor adaptabilidad que la que posee la plántula promedio. El riesgo de plantar grandes áreas con un solo clon surge cuando la adaptabilidad del genotipo clonal es baja y puede ser superada por las condiciones adversas (Zobel y Talbert, 1992).
5. Es necesario un monitoreo permanente de las plantaciones clonales ya que se corren mayores riesgos de susceptibilidad a ciertas enfermedades (Zobel y Talbert, 1992).
6. La especialización de los clones en la absorción de determinados nutrientes puede comprometer la disponibilidad de algún elemento del suelo. El uso de prácticas agronómicas adecuadas contribuye a mantener la capacidad productiva del suelo a largo plazo (Assis, 1996).

## **2.2.3- Técnicas de propagación vegetativa**

### *2.2.3.1- Definiciones*

Para cualquiera de las técnicas de propagación vegetativa existen algunos términos que es preciso definir.

El árbol donador, aquél del cual se han obtenido los propágulos vegetativos, se denomina **orteto**. Los propágulos individuales de un orteto, o de otros propágulos del mismo, se conocen como **rametos**. La totalidad de los propágulos que se originan de un orteto se conoce en conjunto como un **clon** (Zobel y Talbert, 1992).

### *2.2.3.2- Injerto*

El injerto es una herramienta básica del horticultor y se ha utilizado ampliamente en dasonomía para preservar clones y establecer huertos semilleros.

Algunas especies, sobretodo algunas latifoliadas, no se injertan tan fácilmente como la mayoría de las coníferas, por lo que deben hacerse ajustes a los métodos convencionales para obtener un nivel de éxito razonable (Hatmaker y Taft, 1966, citado por Zobel y Talbert, 1992). Esto es especialmente aplicable en el caso de algunas especies de robles (*Quercus*) y nogales (*Juglans*).

Con frecuencia no es una técnica inadecuada de injerto lo que conduce al fracaso, sino más bien el poco cuidado que se le da a la púa o al portainjerto (la púa es la pieza injertada que se ha obtenido del orteto; el portainjerto es la planta en la cual se injertó). Muchos injertos mueren, principalmente a causa de un manejo inadecuado que por un injertado incorrecto en sí mismo.

Dorman, 1976 (citado por Zobel y Talbert, 1992) describe métodos desarrollados para pinos del sur de los Estados Unidos, con un resultado positivo alcanzado de más de 90%.

Un problema importante es la incompatibilidad entre el portainjerto y la púa. Como esta incompatibilidad es clonal, tiene un efecto importante sobre los programas de mejoramiento genético con las pérdidas de clones.

Casi todas las especies muestran cierto grado de incompatibilidad. Zobel y Talbert, 1992, citan que en el caso de pino "loblolly" casi el 20% de los injertos hechos en huertos semilleros muestran cierto grado de incompatibilidad.

### *2.2.3.3- Estacado*

Este método es ampliamente utilizado en muchas especies. Existen grandes avances en los últimos años en eucaliptos (Franclet, 1963; Hartney, 1980; Laplace y Quillet, 1980, citados por Zobel y Talbert, 1992).

Una limitante importante para utilizar el estacado es su dependencia a la edad. Los árboles jóvenes suelen enraizar rápidamente, pero puede ser casi imposible enraizarlos cuando son maduros. Cuando se deja que los árboles crezcan lo suficiente para mostrar su valor genético, suele ser demasiado tarde para enraizarlos (Zobel y Talbert, 1992).

Otra limitante es que en ocasiones los propágulos no crecen hasta formar un árbol normal.

Un impedimento para obtener máximas ganancias en plantaciones, es la gran variabilidad clonal que existe en la capacidad de enraizamiento. Esta variación ocurre sin importar que método se use. En algunas especies muy pocos árboles progenitores responden bien al enraizamiento, y en consecuencia un potencial genético inicialmente amplio puede reducirse a un nivel alarmante (Zobel y Talbert, 1992). Los porcentajes de enraizamiento satisfactorios varían con la especie y las necesidades de las empresas. Por ejemplo, en Aracruz, Brasil, se considera como mínimo un enraizamiento del 75% en *Eucalyptus* para su uso en los programas de plantación (Campinhos e Ikemori, 1980, citado por Zobel y Talbert, 1992).

#### 2.2.3.4- Acodos

Existen dos técnicas de acodos. El proceso de acodo aéreo es aquél en el cual las raíces nacen en una rama intacta por medio de cinchado, lo cual va acompañado por lo general de aplicación de hormonas (Zobel y Talbert, 1992). Un proceso similar es la acodadura. En este proceso las raíces se forman en ramas que tocan o se entierran (Cooper, 1911, citado por Zobel y Talbert, 1992).

Uno de los usos es producir directamente los propágulos necesarios para establecer los huertos semilleros y evitar así el problema de la incompatibilidad.

También se utiliza como método intermedio para obtener raíces en especies en las cuales el estacado de pocos resultados.

#### 2.2.3.5- Fascículos aciculares

Este método se utiliza con pinos pero está en estudio. Aún no se han obtenido resultados satisfactorios para los programas de plantación (Zobel y Talbert, 1992).

#### 2.2.3.6- Propagación *in vitro*

Dentro de la propagación *in vitro* se distinguen la propagación clonal por microestaquilla y la micropropagación.

#### 2.2.3.6.1- Propagación clonal por microestaquilla

Si bien el enraizamiento de estacas es el método más usado para la multiplicación de clones seleccionados, debido a resultados satisfactorios, ésta presenta problemas como la necesidad de un manejo intensivo y dificultades de enraizamiento (Assis et al, 1992).

El proceso de maduración es un fenómeno que generalmente afecta a las especies leñosas de acuerdo con su desarrollo ontogenético. Una de las consecuencias de esto, es la pérdida de la capacidad de enraizamiento en las plantas adultas (Assis et al, 1992).

Para solucionar este problema, se han llevado a cabo investigaciones para rejuvenecer partes de plantas maduras (Assis et al, 1992).

Entre las técnicas utilizadas para el rejuvenecimiento de partes vegetativas de plantas adultas, la propagación por estaquilla ha dado resultados positivos. Existen estudios en varias especies leñosas como, *Eucalyptus urophylla* (Gonçalves, 1986), *Corylus avellana* (Mele y Messager, 1986), *Eucalyptus rudis* (Badia, 1982), *Eucalyptus marginata* (Benett y McComb, 1986) (citados por Assis et al, 1992).

Los clones se cultivan *in vitro*, para promover el rejuvenecimiento, multiplicarlos y enraizarlos para luego transplantarlos. Luego, los ápices caulinares conteniendo 2 a 3 pares de hojas son retirados, constituyendo las microestaquillas.

En 1992, Assis et al, obtuvieron un enraizamiento medio del 90% de las microestaquillas de clones de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus saligna*.

La calidad del sistema radicular es superior, comparando con el método tradicional de estacado, principalmente en relación con el hábito de crecimiento y a la conexión vascular entre las raíces adventicias y las estacas. La emisión de raíces también ocurre antes, con lo que se observan menores pérdidas debido al ataque de hongos.

#### 2.2.3.6.2- Micropropagación

Consiste en producir plantas semejantes a la planta madre mediante la estimulación de la capacidad natural de propagación vegetativa de la especie o por la inducción de una nueva organogénesis de yemas y raíces. Permite una mayor velocidad de multiplicación y es de especial interés en las especies de propagación natural lenta; además permite producir y almacenar un gran número de plantas en un espacio reducido. Otra ventaja es que pueden programarse los cultivos todo el año sin depender de las estaciones (Gravina et al, 1992).

Es muy importante para lograr un resultado exitoso partir de plantas madres sanas, de buen vigor y fisiológicamente jóvenes.

Segmentos nodales, hipocótilos y hojas son utilizados como explantos para la micropropagación en eucaliptos, lográndose la formación de yemas y de raíces satisfactoriamente. Los segmentos nodales deben tener por lo menos una yema terminal o lateral (Sasson, 1988).

En los programas de micropropagación es muy importante ejecutar un monitoreo preciso de cada clon, de modo de que aquel clon que presente problemas para enraizar, sea retirado del programa para seguir trabajando con los demás.

## 2.3- BIOTECNOLOGÍA EN EL DESARROLLO FORESTAL

Existen distintas biotécnicas que se aplican a la resolución de problemas productivos y en líneas de investigación acerca de los procesos biológicos de las plantas.

Las distintas áreas de trabajo comprenden a grandes rasgos al cultivo de tejidos y al mejoramiento genético.

El término cultivo de tejidos, se utiliza en muchas ocasiones en un sentido amplio para describir técnicas requeridas para la micropropagación, pero en un sentido estricto el cultivo de tejidos se utiliza solamente para la propagación de células o callos en un medio estéril (Aldabalde et al, 1997).

A partir de la década del 50 se trabaja e investiga con especies forestales para encontrar variedades y especies más adaptadas y con mayor potencial productivo.

En este momento se incluye la técnica de cultivo de tejidos y órganos diferenciados como forma de lograr el objetivo planteado (Sasson, 1988).

A partir de 1952 comienzan los primeros intentos en el cultivo de tejidos, pero recién desde 1963 la técnica de micropropagación *in vitro* se extiende rápidamente por todo el mundo, especialmente en los países desarrollados.

Desde 1970, aparecen muy buenos resultados en la selección de especies y variedades de alto rendimiento, resistentes a enfermedades, al ataque de insectos y a condiciones de sequía. Además éstas pueden crecer con menor cantidad de fertilizantes y pesticidas.

Estos estudios están basados en técnicas de retrocruzamientos y cruzamientos para lograr híbridos y plantas superiores, combinado con técnicas de cultivo de tejidos y recombinación genética con el fin de propagar cultivares de interés rápidamente y crear otros nuevos (Sasson, 1988).

Toda la metodología anterior obviamente se basa en mecanismos moleculares y celulares responsables de la biodiversidad genética.

El cultivo de células ofrece además una fuente de variación adicional (variación somaclonal), la producción de híbridos somáticos y plantas haploides para desarrollar un programa de mejoramiento genético de las especies de interés.

Un aporte de la técnica del cultivo de tejidos ha sido demostrar que las células somáticas son capaces de producir estructuras similares a embriones cigóticos (Stewart y Reinert, 1959, citados por Pérez Gomar y Trujillo, 1995). Este descubrimiento es precedido por la observación del fenómeno natural de la embriogénesis adventicia en la cual se forman embriones a partir de células vegetativas o reproductivas sin mediar la unión sexual. Este proceso ha sido visto en por lo menos 300 especies de 35 familias, entre las cuales las más importantes son las *Gramineae*, *Rosaceae* y *Rutaceae* (Richards, 1986; Hanna y Bashaw, 1987, citado por Pérez Gomar y Trujillo, 1995).

El desarrollo de la embriogénesis somática y de la tecnología para producir semillas artificiales podrá superar, después de una investigación considerable las limitaciones de costo del material de siembra antes mencionado (Haines, 1994).

## 2.4- MICROPROPAGACIÓN

### 2.4.1- Consideraciones generales

La aptitud de los vegetales de poder ser multiplicados vegetativamente puede ser considerada como una potencialidad fundamental.

En principio toda célula vegetal diploide posee en su núcleo la totalidad de la información genética. La reconstitución de un individuo, por vía asexual, a partir de una célula o de un pequeño número es la expresión de la **totipotencia celular**. La misma fue descubierta en 1902 por Haberlandt (Margara, 1984).

Sin embargo, para que esta capacidad se manifieste, son necesarias dos condiciones:

- El aislamiento de las células somáticas que las libera de correlaciones fisiológicas y de inhibiciones eventuales, ejerciéndose *in situ* en el seno de los tejidos.
- El aporte por el ambiente de un complejo de sustancias tróficas y de reguladores de crecimiento. En condiciones normales, son las sustancias suministradas por el albumen las que aseguran el desarrollo normal del cigoto.

La propagación vegetativa, cualquiera sea el método utilizado, implica la formación de nuevos meristemas.

Todas las células de un organismo provienen de un mismo cigoto. En el curso de la ontogénesis, el establecimiento de los diferentes tejidos implica la **diferenciación** de las células. Los cambios implican un aumento del volumen celular, modificación de los constituyentes celulares, entre otros.

A la inversa, los tejidos ya diferenciados pueden sufrir una **dediferenciación** y recuperar las características citológicas y las potencialidades de las células embrionarias.

## **2.4.2- Antecedentes**

En 1929, Laibach consigue cultivar embriones de lino y White, en 1932, obtiene un cultivo indefinido de raíz de tomate en un medio líquido conteniendo sales minerales, extracto de levadura y azúcar (Gravina et al, 1992). Estos fueron los primeros trabajos en cultivos de tejidos.

En 1939 Gautheret y Nobecourt, trabajando con zanahoria, y White, con tabaco, lograron la multiplicación indefinida de estos materiales. En 1946, Ball obtuvo plantas completas de lupino a partir de yemas apicales y en 1950, logró obtener órganos de *Sequoia sempervirens* a partir de un cultivo de callo (Gravina et al, 1992).

Con el descubrimiento de la kinetina (sustancia con gran poder de formación de callos) y posteriormente de otras citoquininas se logró a voluntad la neoformación de yemas adventicias. Éstas, tratadas con auxinas y giberelinas, enraizaban y formaban plantas enteras (Margara, 1984).

La multiplicación vegetativa *in vitro* se vio facilitada con la puesta a punto de nuevas soluciones minerales, a partir de 1962.

En otras áreas de investigación, en las décadas de los 50 y 60 se registraron trabajos sobre cultivos de meristemos libres de virus, formación de embriones somáticos y producción de embriones a partir de células polínicas (Margara, 1984).

### *2.2.2.1- Micropropagación en Eucalyptus*

En 1964, se publica el primer trabajo sobre cultivo de tejidos de *Eucalyptus in vitro*, por Marcavillaça y Montaldi de INTA Castelar, en Argentina.

A partir de 1970, Cresswell, desarrolla la técnica de micropropagación *in vitro*, siendo exitosos los cultivos de tejidos de ápices caulinares de plantines de *E. brancroftii*, *E. grandis*, y *E. deglupta*. En el caso de *E. grandis*, son producidas plantas *in vitro* ya sea de semillas germinadas *in vitro* o mediante el cultivo de yemas de rebrotes jóvenes de árboles elite. Las plantas obtenidas son llevadas a campo en 1975, lográndose un rendimiento de 20.000 plantas por mes provenientes de 18 clones (Sasson, 1988).

En ese mismo año se obtienen resultados positivos en micropropagación en las siguientes especies: *E. grandis*, *E. gunnii*, *E. dalrympleana*, *E. pauciflora* y *E. ficifolia* (Sasson, 1988).

Desde 1973, la empresa francesa AFOCEL ha estado estudiando la micropropagación *in vitro* de especies de eucaliptos, con el objetivo de producir clones a gran escala, seleccionados por resistencia a frío y calidad de madera (Poisonnier, 1990).

Es importante destacar los grandes avances logrados en los trabajos de micropropagación en eucaliptos desde la década del 70 en propagación de callos y cultivo de órganos de materiales adultos (Sasson, 1988).

Regeneración de plantas a partir de callos se ha reportado para *E.citriodora* (Aneja y Atal, 1969), *E.alba* (Kitahara y Caldas, 1975) y *E.grandis* (Lakshmi-Sita, 1979), y a partir de segmentos nodales para *E.grandis* (De Fossard et al, 1974; Cresswell y Nitsch, 1975), *E.ficifolia* (De Fossard y Muell, 1978) (citados por Mehra-Palta, 1982).

También se ha reportado diferenciación de un pequeño número de plantas de un callo de cotiledones de *E.citriodora* (Lakshmi-Sita, 1979 citado por Mehra-Palta, 1982).

Callos obtenidos de tejidos de tallos de *E.grandis* no se diferenciaron en un amplio rango de concentraciones de citoquininas/auxinas (De Fossard et al, 1974 citado por Mehra-Palta, 1982).

Un área de investigación muy estudiada es la propagación a partir de tejidos maduros. Investigadores del sur de la India trabajaron con éxito en la propagación vegetativa de *E.torelliana* y *E.camaldulensis* a partir de plántulas por estacas, pero la propagación clonal de árboles adultos no tuvo éxito por medios convencionales (Gupta et al, 1983).

Recientemente, se han desarrollado métodos de cultivos de tejidos (Gupta et al, 1978; Hartney y Baker, 1980; Mehra-Palta, 1982; Bennet y McComb, 1982; Durand-Cresswell et al, 1982). Sin embargo, en la mayoría de estos trabajos la organogénesis se obtuvo a partir de tejidos embrionarios o de plántulas. La regeneración a partir de árboles maduros, en eucaliptos, es aún rara (Gupta et al, 1981; Bennet y McComb, 1982; Mascarenhas et al, 1982) (citados por Gupta et al, 1983).

Existen trabajos con plántulas de *E.marginata* (Hartney y Baker, 1980) y un trabajo reciente de embrionia (Ouyang et al, 1980, 1981). La clonación de eucaliptos con plántulas se usa cuando se producen híbridos y mutantes, pero el uso de explantos a partir árboles maduros presenta un gran potencial.

Otros eucaliptos fueron clonados por medio de cultivo de órganos a partir de árboles maduros incluyendo *E.grandis* (Cresswell y Nitsch, 1975), *E.ficifolia* (de Fossard 1978; Baker et al, 1977) y *E.citriodora* (Gupta et al, 1981) (citados por Bennet y McComb, 1982). El uso de yemas florales provee abundante material estéril para ser cultivado, a pesar del hecho de que están disponibles estacionalmente, y que los árboles difieren en su habilidad de regenerarse. Sin embargo, logros anteriores en regenerar plantas enteras a partir de callos de eucaliptos de árboles maduros solo fracasaron en el enraizamiento (de Fossard, 1974; Lee y de Fossard, 1974). Una regeneración completa se logró en 3 casos: de hipocótilo de *E.alba* (Khitara y Caldas, 1975) y de cotiledones y lignotubérculos de *E.citriodora* (Aneja y Atal, 1969; Lakshmi Sita, 1979). La regeneración a partir de callos de anteras de *E.marginata* muestra que los tejidos florales permiten la performance en cultivos más rápidamente que a partir de partes vegetativas de árboles maduros (Tran Thanh Van 1973; Vardi et al, 1975; Radojevic, 1979 citados por Bennet y McComb, 1982).

Otros investigadores tuvieron dificultades en el enraizamiento de cultivos a partir de árboles maduros mientras que en cultivos a partir de plántulas no se presentó esta dificultad. Esto podría deberse a niveles altos de algún inhibidor radicular presente en los árboles maduros (Paton et al, 1970) (citado por Bennet y McComb, 1982).

La regeneración de plantas a partir de callos de *Eucalyptus leichow* seleccionados se logra en 1981, obteniéndose miles de plántulas homogéneas, pudiéndose mantener solo unas semanas (Ouyang et al, 1982, citado por Warrag et al, 1991).

Hartney (1982) trabajó con éxito en las siguientes especies: *E. camaldulensis*, *E. curtisi*, *E. ficifolia*, *E. grandis*, *E. obtusifolia* y *E. rudis* a través del cultivo de yemas axilares de rebrotes jóvenes de árboles seleccionados.

En 1984, Diallo y Duhoux en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Dakar en Senegal lograron el cultivo de yemas de cotiledones y la formación de brotes de *E. camaldulensis*.

### **2.4.3- Ventajas y desventajas de la micropropagación**

Dentro de las ventajas de la micropropagación podemos citar (Pierik, 1987):

1. La propagación *in vitro* es más rápida que *in vivo*.
2. Es posible propagar especies que no se pueden propagar *in vivo*.
3. El crecimiento de las plantas *in vitro* es más fuerte, fundamentalmente debido al rejuvenecimiento del material vegetal.
4. Es posible obtener plantas saneadas.
5. Se puede partir de poco material vegetal.
6. El área de trabajo es reducida.
7. Es posible independizarse del efecto estacional.
8. Es posible poner en el mercado nuevos cultivares más rápido.

Como desventajas se citan (Pierik, 1987):

1. En algunos sistemas de propagación la estabilidad genética es débil (variación somaclonal).
2. En algunos casos se dificulta la inducción al enraizado.
3. La transferencia al suelo es problemática.
4. Los clones pueden ser atacados en masa por una nueva cepa de patógenos.
5. La capacidad de regeneración puede perderse por sucesivas repeticiones de cultivos de callo o suspensiones celulares.
6. Se requiere infraestructura y material caros.

### **2.4.4- Técnicas de micropropagación**

La variedad de técnicas que pueden ser usadas para lograr un buen crecimiento y desarrollo de la planta *in vitro* es dependiente de la especie en cuestión e incluso dentro de una misma especie varían los requerimientos según la procedencia, familia, así como dentro y entre individuos (Aldabalde et al, 1997).

Las técnicas de micropropagación pueden agruparse en tres categorías (Pierik, 1987; Thorpe et al, 1991). Ver fig. 1.

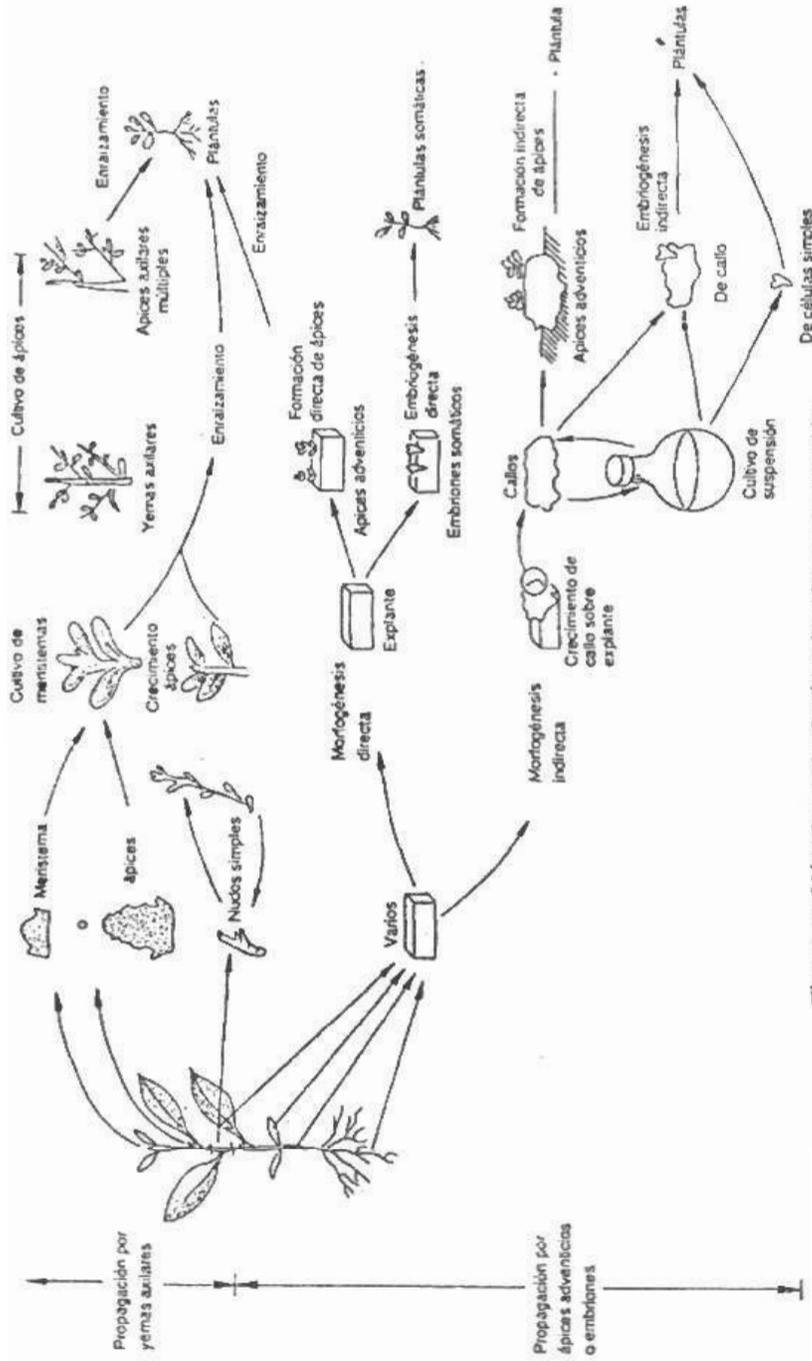


Figura 1. Métodos principales de micropropagación (E. George and Sherrington, 1984). Tomado de "Plant Propagation by Tissue Culture".

### **Brotos apicales y/o axilares:**

Es un método directo que involucra la multiplicación de yemas preformadas, comúnmente sin la formación de callo y produce en general cultivos genéticamente estables.

Produce el menor número de plantas ya que parte de un número limitado de yemas axilares por medio de cultivo. A pesar de que la tasa de multiplicación inicial es baja, ésta aumenta con los sucesivos repiques hasta que se estabiliza.

Esta técnica es utilizada tanto para gimnospermas como angiospermas.

Dentro de este procedimiento se distinguen dos variantes:

#### **1. Método del nudo simple.**

Consiste en colocar un segmento nodal con el objetivo de formar una nueva yema pero sin dejar que se desarrolle el brote inicial. Cada nueva yema axilar es repicada y así sucesivamente (Pierik, 1987).

#### **2. Método de yema axilar.**

Es un método muy similar al anterior. La mayor diferencia es la aplicación exógena de citoquininas, lo que favorece una proliferación de yemas mayor (por ruptura de la dominancia apical). El repique se realiza también a un medio rico en citoquinina (Pierik, 1987).

### **Brotos adventicios:**

Este método es menos usado en angiospermas que en gimnospermas.

Ofrece un mayor potencial que el método anterior debido a que se produce una inducción en otros sitios que los brotes meristemáticos.

Cuanto más joven es el tejido, mejor responde a los tratamientos *in vitro* para producir *de novo* organogénesis.

El proceso involucra una inducción por tratamiento con fitohormonas para producir una diferenciación del primordio y desarrollo posterior de nuevos brotes. También se pueden producir brotes adventicios en forma indirecta, a través de la formación de callo. La formación del mismo y su mantenimiento es fácil en angiospermas, pero requiere del agregado de auxinas y citoquininas en determinadas proporciones (Pierik, 1987).

### **Embriogénesis somática:**

El término embriogénesis somática fue definido por Tokin en 1964 para designar la formación de organismos a partir de una célula o un grupo de células somáticas (Margara, 1984). Usualmente, se la conoce como una alternativa de regeneración *in vitro* ocurriendo tanto directamente a partir de células de una estructura organizada o indirectamente, con un número de ciclos mitóticos no embriogénicos desorganizados

interpuestos entre el explanto y las estructuras embrionarias (Pérez Gomar y Trujillo, 1995).

#### **2.4.5- Especies de *Eucalyptus* utilizadas en la micropropagación**

Por su importancia a escala mundial, las especies de *Eucalyptus* más citadas en trabajos son: *E. grandis*, *E. globulus ssp. globulus*, *E. sideroxylon*, *E. camaldulensis* y *E. tereticornis*.

Existen además otras especies, que han comenzado a suscitar interés por su valor productivo.

*Eucalyptus globulus* tiene una creciente demanda en el mercado mundial del papel debido a sus características pulpables.

*Eucalyptus grandis* es una importante fuente de fibra de alta calidad para la producción de pulpa y madera elaborada en áreas subtropicales en rotaciones cortas.

#### **2.4.6- Etapas de la micropropagación**

La micropropagación se divide en las siguientes etapas (Debergh y Read, 1991):

##### **Etapa 0: Etapa preparatoria**

Esta fase se relaciona con el tratamiento del material vegetal antes de que la propagación comience. Debe de evitarse cualquier clase de contaminación (insectos, hongos, bacterias, etc.).

Las estacas de *Eucalyptus* de 50 a 60cm de largo son traídas desde el monte con cuidado de no dañar la corteza, afin de no perder la conexión con los haces vasculares. Es importante evitar la deshidratación.

##### **Etapa 1: Iniciación del cultivo de tejidos**

Se produce el establecimiento de un cultivo aséptico de los explantos. Los mismos pueden ser yemas, meristemas, etc.

La edad de la planta madre, la edad fisiológica del explanto y el tamaño del mismo son determinantes en el éxito del procedimiento (Franclet et al, 1987, citado por Debergh y Read, 1991).

##### **Etapa 2: Multiplicación**

En esta etapa, el material vegetal provee de brotes que son puestos en medios frescos para continuar la proliferación. El objetivo principal es aumentar y mantener el stock de plantas (Debergh y Read, 1991).

La cantidad de subcultivos depende de las características del material. Un elemento importante a considerar es el rejuvenecimiento que se logra con los repiques. Para el caso de *Eucalyptus* se considera que un promedio de 6 a 7 repiques es necesario para reactivar y rejuvenecer el material (Eldridge, 1994, citado por Aldabalde et al, 1997).

### Etapa 3: **Elongación y Enraizado**

En esta etapa se interrumpe la proliferación de brotes, repicando los explantos a un medio de elongación. Luego de elongados, se repican a un medio de enraizamiento. Lo más importante de esta etapa es la calidad, cantidad de material, número y tamaño de brotes, número de explantos enraizados, número de raíces y largo de las mismas (Debergh y Read, 1991).

### Etapa 4: **Trasplante y Aclimatación**

El pasaje a las condiciones *in vivo* es muy delicado ya que las plantas tienen la cutícula poco desarrollada, las hojas son fotosintéticamente poco activas y las raíces poco funcionales (Gravina et al, 1992).

Estas diferencias morfológicas y fisiológicas entre las plantas creciendo *in vitro* o *in vivo*, hace que sea necesario un período de aclimatación que permita a las plántulas que van a salir de los tubos, tolerar las condiciones de menor humedad, variaciones de temperatura e intensidad luminosa existentes en un ambiente no controlado (Gravina et al, 1992).

El proceso de aclimatación puede empezar mientras las plántulas se encuentran aún *in vitro*, pudiéndose reducir la humedad relativa del ambiente de la cámara, o bien llevar los tubos abiertos a un ambiente estéril con las condiciones ambientales definitivas. Sin embargo, debido a la anatomía de las plantas, es conveniente mantener una humedad relativa alta en los primeros días luego del trasplante. Es necesario que el mecanismo de apertura de los estomas se desarrolle completamente. Este factor es crítico para la supervivencia de las plantas en invernáculo. En algunos casos se cita el uso de antitranspirantes, pero su aplicación es restringida a determinadas plantas, por problemas de fitotoxicidad (Pierik, 1987; Preece y Sutter, 1991).

En condiciones *in vitro* los niveles de intensidad lumínica son relativamente bajos. En consecuencia las hojas de las plantas son más delgadas y oscuras. Una vez que se las somete a condiciones de alta luminosidad, las hojas se vuelven cloróticas, se marchitan y secan (Preece y Sutter, 1991). El sombreado reduciría la demanda transpiratoria y la excesiva luz que destruye las moléculas de clorofila. Luego de un período de sombreado, las plantas pueden ser trasladadas gradualmente a sitios de mayor luminosidad.

También es importante controlar el estado sanitario de las plantas y la temperatura del invernáculo para lograr un trasplante exitoso (Preece y Sutter, 1991).

El desarrollo radicular es un factor determinante en el trasplante. Las raíces desarrolladas *in vitro* presentan epidermis no suberificada, con pocos pelos radiculares, con una conexión vascular pobre y son más delgadas. Generalmente éstas son sustituidas por otras funcionales.

Las especies de plantas, que en condiciones naturales de crecimiento, forman asociaciones simbióticas, no cuentan con los microorganismos necesarios al momento de la transferencia desde los tubos de ensayo a las macetas, debido a que generalmente el sustrato es esterilizado.

Si bien, en muchos casos se emplean sustratos comerciales ricos en nutrientes o son fertilizados, la ausencia de microflora afecta a especies que son simbióticas obligadas o simplemente mejoran su performance con estas asociaciones.

En relación con los problemas asociados con la funcionalidad de las raíces existen varias medidas a tener en cuenta (Pierik, 1987):

1. Permitir el desarrollo de los primordios radiculares *in vitro*. El desarrollo final se realizará *in vivo*.
2. Cuando sea posible, desarrollar las raíces en un ambiente que permita su funcionalidad en el suelo. Se sugiere un medio líquido.
3. Transferir toda la etapa del enraizamiento al suelo. Es necesario embeber las plantas en auxinas para facilitar el desarrollo radicular. Este sistema no tiene éxito en todas las plantas.
4. Establecer asociaciones simbióticas que permitan un buen desarrollo de la planta y mejoren la absorción de nutrientes. Dentro de estas asociaciones se podrían considerar a las micorrizas por permitir una mayor exploración del suelo a través de las hifas y una mayor absorción de nutrientes poco móviles, como el fósforo.

## 2.5- LAS MICORRIZAS

### 2.5.1-Definición

El término **micorriza** fue propuesto por Frank, en 1885, para describir unas estructuras que no provocaban síntomas de enfermedad (lo que ocurre con la infección de agentes patógenos) sino que funcionaban como verdaderas simbiosis.

La simbiosis micorrízica es una estrategia nutricional que han desarrollado la mayoría de las plantas y algunos hongos desde sus propios orígenes, hace unos 400 millones de años, que les asegura un beneficio mutuo, básicamente de tipo alimentario (Honrubia, 1992; Azcón y Barea, 1980).

Pirozynski y Malloch (1975) postularon que la evolución de plantas terrestres desde ambientes semiacuáticos fue posible gracias a relaciones mutualísticas con algas y hongos. La micorrización habría evolucionado como la norma de la nutrición terrestre y no como la excepción.

Se reconoce que las micorrizas juegan un papel clave en la supervivencia de las plantas y en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema. Se las encuentra en casi todos los ecosistemas, tanto agrícolas como forestales, tipos de suelos y climas variados de la tierra (Honrubia, 1992).

Aproximadamente el 95% de especies de plantas vasculares pertenecen a familias característicamente micorrizadas. Se han descrito a las familias *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*, *Fumariaceae*, *Cyperaceae*, *Commelinaceae*, *Urticaceae* y *Poligonaceae*, como no formadoras de micorrizas (Azcón y Barea, 1980).

La planta suministra al hongo nutrientes fotosintéticos y un nicho ecológico protegido de fenómenos de antagonismo microbiano en la rizósfera. Por su parte, el hongo aporta nutrientes minerales del suelo y juega un rol importante en la traslocación de iones fosfato. En suelos con bajo contenido de fósforo asimilable, las micorrizas representan una contribución fundamental para la economía nutritiva de la planta (Azcón y Barea, 1980).

## **2.5.2- Tipos de micorrizas**

Se reconocen siete tipos de micorrizas, basándose en las características de infección y en los organismos mutualistas que la establecen. Los grupos son ectomicorrizas, endomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutoides, ericoides, monotropoides y orquidáceas (Harley y Smith, 1983; Honrubia, 1992). Sin embargo, para evitar complicaciones se trabaja con dos grandes grupos: las ectomicorrizas y las endomicorrizas. Las primeras se caracterizan por presentar un manto fúngico externo y el micelio que no penetra en las células del cortex radicular. Las segundas no presentan manto externo y el micelio sí penetra las células corticales.

Todos los hongos formadores de micorrizas pertenecen a los siguientes grupos taxonómicos: *Ascomycotina*, *Basidiomycotina*, *Deuteromycotina* y *Zigomycotina*, todos ellos incluidos dentro de la División *Eumycota*.

### **2.5.2.1-Las ectomicorrizas**

Los hongos ectomicorríticos son en su mayoría basidiomicetes. Dentro de esta subdivisión, la clase Hymenomycetes cuenta con los géneros más representativos: *Boletus*, *Cortinarius*, *Suillus*, *Amanita*, *Tricholoma*, *Laccaria* y *Thelephora*. Dentro de la clase Gasteromycetes se encuentran los géneros *Rhizopogon*, *Scleroderma* y *Pisolithus* (Marx y Krupa, 1978; Marx, 1991; Honrubia, 1992).

Dentro de la subdivisión *Ascomycotina*, existen también numerosos géneros como *Genea*, *Geopora* *Tuber*, etc.

Se menciona solo un género ectomicorrítico dentro de la subdivisión *Deuteromycotina*, *Cenococcum*, al igual que dentro de la subdivisión *Zigomycotina*, el género *Endogone* (Marx, 1991; Honrubia, 1992).

Se cita que solo el 3% de la flora de todo el mundo forman ectomicorrizas (Trappe, 1977, Honrubia, 1992). Sin embargo, Marx (1991) menciona que 10% de la flora establece este tipo de asociación.

Entre los géneros obligadamente ectomicorríticos se encuentran *Abies*, *Carpinus*, *Fagus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* (Meyer, 1973), *Tsuga*, *Pseudotsuga* (Zak, 1973) y *Quercus* (Meyer, 1973). Entre los géneros ectomicorríticos facultativos se encuentran *Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Corylus*, *Cupressus*, *Eucalyptus*, *Juniperus*, *Pyrus*, *Salix* y *Ulmus* (Meyer, 1973) (citados por Alvarez, 1991). Algunos géneros son capaces de formar ecto y/o endomicorrizas según las condiciones del suelo y edad del árbol (Marx, 1991; Arines, 1991): *Alnus*, *Cupressus*, *Eucalyptus*, *Casuarina*, *Juniperus*, *Tilia*, *Ulmus*, *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Malus* y *Arbutus*.

La morfología y anatomía de las ectomicorrizas son variadas según el grado de desarrollo, el hongo asociado o la presencia de más de una especie fúngica (Azcón-G de Aguilar y Barea, 1980, Honrubia, 1992). Sin embargo, estas micorrizas se caracterizan por la presencia de un manto fúngico alrededor de las raíces secundarias y cortas. Estas raíces presentan ápice redondeado y crecimiento limitado. El micelio fúngico penetra intercelularmente en el cortex, formando la red de Hartig. Dichas hifas son aseptadas a pesar que los hongos pertenecen a las subdivisiones con micelio septado. Esto sugiere una estrategia del hongo para poder traslocar con mayor facilidad los nutrientes que le aporta la planta huésped. Dentro de la planta, el micelio jamás penetra en la endodermis, ni en el interior de las células corticales (Honrubia, 1992).

Gracias a su gran superficie, las ectomicorrizas son particularmente importantes en la absorción de nutrientes que se encuentran en bajas concentraciones en la solución del suelo o aquéllos que son poco móviles, como el fósforo. Se ha demostrado que las ectomicorrizas formadas por diferentes hongos en las mismas especies de árboles tienen capacidades diferentes en la absorción de este elemento (Kropp y Gilles-Langlois, 1990).

#### 2.5.2.2- Las endomicorrizas (VAM)

Solo seis géneros pertenecientes a la familia *Endogonaceae* de la clase *Zygomycotina* forman micorrizas vesículo-arbusculares. Ellos son: *Acaulospora*, *Entrophosphora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora*. Incluyen 125 especies que son responsables de inducir esta simbiosis (Honrubia, 1992).

Los hongos que forman VAM tienen un espectro de huéspedes muy amplio, por lo que se los cataloga de inespecíficos. Si bien se registran diferentes grados de susceptibilidad en las plantas huéspedes y en la adaptabilidad del hongo a determinadas condiciones, la especificidad estaría más en relación con una interacción suelo- condiciones de cultivo que con un huésped en particular (Azcón y Barea, 1980).

Según Mosse (1973), cualquier hongo VAM puede infectar cualquier especie de planta, pero el grado de infección y sus efectos varían según las combinaciones que se den. Esto está de acuerdo con lo afirmado por Hayman (1982) y Anderson (1988).

Las raíces VAM se caracterizan por no presentar diferencias con las raíces no infectadas. Las hifas del hongo penetran inter e intracelularmente en la corteza. La endodermis, meristemo y vasos no son invadidos. Se desarrollan dos estructuras características. Los arbuscúlos, que se forman por repetidas ramificaciones dicotómicas de una hifa, resultando en una gran superficie de contacto y las vesículas, que son estructuras de reserva ubicadas en el extremo de las hifas.

El desarrollo en el interior de la planta va acompañado por el desarrollo externo de hifas que constituye el sistema de absorción de nutrientes. Sobre este micelio se forman las esporas que van madurando hasta convertirse en clamidosporas. Determinadas especies desarrollan también esporocarpos.

Las VAM son las más comunes en los suelos. Se encuentran en praderas, sabanas, bosques densos, semidesiertos, dunas, etc. Son raras en podzols que albergan árboles ectomicorríticos puros, en tierras ácidas cálidas dominadas por plantas con micorrizas ericoidales y en suelos muy húmedos (Hayman, 1982).

### **2.5.3- Micorrizas en *Eucalyptus***

Van der Bijl, en 1917, fue el primer científico en estudiar la presencia de hongos micorríticos en *Eucalyptus*. En 1926, Samuel reconoció estructuras micorríticas y en 1934, Smith y Pope, realizaron una descripción detallada de la estructura típica de las micorrizas en *Eucalyptus* (Chilvers, 1968).

Durante la década del 60, se realizaron diversos estudios que mostraron que los eucaliptos formaban micorrizas en sitios exóticos. Hacia finales de esa misma década, quedó demostrado que el fenómeno de micorrización estaba difundido en todo el género *Eucalyptus* y que muchos hongos estaban involucrados en estas asociaciones (Chilvers, 1968).

#### ***2.5.3.1- Estructura de las micorrizas en *Eucalyptus****

En el género *Eucalyptus* se distinguen cuatro tipos de micorrizas: las endomicorrizas, las ectomicorrizas típicas, las ectendomicorrizas y las ectomicorrizas superficiales e intermedias.

La anatomía de las dos primeras ya fue descrita en el punto 2.5.2.

Las ectendomicorrizas presentan una penetración intracelular de la epidermis o corteza del huésped además del desarrollo micelial externo a la raíz. Las ectomicorrizas superficiales e intermedias tienen la anatomía las raíces sin infectar salvo por la presencia de un capuchón alrededor de las mismas. No se produce una penetración intercelular de la epidermis para formar la red de Hartig (Chilvers, 1968).

### 2.5.3.2- Hongos micorríticos en *Eucalyptus*

Se han identificado 154 especies de hongos micorríticos como posibles formadores de estas asociaciones simbióticas en *Eucalyptus*. Solo nueve especies formarían una constante asociación con el género *Eucalyptus*.

Los hongos micorríticos, que forman ectomicorrizas típicas, más conocidos son *Amanita*, *Boletus*, *Lactarius*, *Russula*, *Laccaria* y *Pisolithus*. Aquéllos que forman ectomicorrizas superficiales o intermedias son *Cortinarius* e *Hysterangium*. Los hongos endomicorríticos son *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Glomus* (Chilvers 1968).

### 2.5.4-Proceso de infección

Smith y Gianinazzi-Pearson (1988), sugieren que la interacción hongo- planta es altamente compatible en cualquier nivel o estado estructural y/o fisiológico. Según dichos autores, no existiría evidencia de un mecanismo de control genético, como el sistema gen por gen que opera en los sistemas con patógenos. Mecanismos confiriendo resistencia específica no serían de esperar en simbiosis mutualísticas, pero no se debería descartar algún tipo de resistencia general.

En estudios realizados con *Rhizobium* y *Agrobacterium*, Bolton et al, 1986 y Mulligan et al, 1985, citados por Anderson (1988), encontraron que algunos fenoles preparan al organismo para ser colonizado. Los fenoles inducen la expresión de los genes que regulan otros genes promotores de la colonización. A pesar de que el estudio de la composición de exudados de plantas micorrizadas y no micorrizadas se enfocó en fuentes de nutrientes como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, el rol de los fenoles en el proceso de control genético en hongos micorríticos debe ser tenido en consideración.

Bonfante-Fasolo et al, 1982 (citados por Anderson en 1988), encontraron fibras bien definidas en forma radial a partir de hifas de un hongo micorrítico ericoidal en contacto con las raíces de una planta huésped. La ausencia de estas fibras en cultivo puro sugiere que genes involucrados en su expresión pueden ser activados por la planta.

En estudios posteriores, Gianinazzi (1991), cita que la formación de VAM y su funcionamiento deben estar bajo control genético en las plantas ancestrales y luego muy poco modificados en la evolución. En consecuencia es altamente probable que productos genéticos similares estén involucrados en el reconocimiento planta- hongo dando diferentes combinaciones, infección fúngica- reconocimiento de la planta, integración morfológica y compatibilidad funcional.

Inmediatamente luego de contactar su huésped, los hongos VA forman apresorios más o menos definidos, lo que indica que se produjo alguna clase de reconocimiento.

La investigadora sugiere que genes silenciosos se activan cuando el hongo entra en contacto con los tejidos de la planta permitiendo el crecimiento del hongo y su diferenciación en la raíz.

Piché y Peterson en 1985 (citados por Anderson en 1988), encontraron un polisacárido asociado con las hifas de un hongo ectomicorrítico solo cuando estaba en contacto con las raíces de una conífera.

El proceso de invasión es altamente regulado, pero se sabe muy poco acerca de las señales que determinan la morfología de la colonización de las hifas en los tejidos corticales.

En 1982, Chilvers y Gust, estudiaron la tasa de crecimiento de las micorrizas en *Eucalyptus st-johnii* y los órdenes de raíces que eran infectadas por *Pisolithus tinctorius*. En este estudio se vio que las raíces de 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> orden eran más micorrizadas que las de 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> orden y se sugiere que las diferencias en la tasa de crecimiento tenían que ver con esto.

Wilcox (1967, citado por Chilvers y Gust) también ligaron la formación de micorrizas con tasas de crecimiento en pinos; al igual que Harley (1969, citado por Chilvers y Gust), en hayas con diferencias anatómicas y frecuencias de micorrización.

La tasa media de crecimiento de los diferentes órdenes de las raíces micorrizadas también disminuyen desde el 2<sup>do</sup> al 5<sup>to</sup> orden pero el mayor cambio se produce del 2<sup>do</sup> al 3<sup>er</sup>. De nuevo las micorrizas crecen mucho más despacio que las no infectadas en el orden equivalente de jerarquía.

A pesar de la tasa inicial más lenta de crecimiento, las micorrizas continúan creciendo por más tiempo que las no infectadas.

Comparando las posiciones de las ramificaciones subsiguientes en diferentes tiempos, es claro que no hay elongación de la micorriza detrás de la región de la punta. El crecimiento a partir del ápice es un continuo proceso de construcción de un órgano dual a partir de un tejido modificado. Cuando la micorriza es iniciada, el proceso de infección se enfoca en el ápice.

La usual configuración de la ramificación de las raíces (las raíces primarias orientadas verticalmente hacia abajo, las secundarias creciendo en ángulo agudo, las terciarias emergiendo a ambos lados de las secundarias) hacen que las terciarias creciendo en ángulo a través de la dirección de avance del hongo sean más fáciles de interceptar.

Otro factor es el tiempo que demoran en emerger los distintos órdenes. Aunque el hongo crezca a lo largo de las raíces secundarias, es frecuente que intercepte las terciarias que emergen como ramificaciones laterales de las secundarias.

Las raíces primarias y secundarias escapan al hongo como resultado de sus rápidos crecimientos y las micorrizas envuelven las terciarias.

Horan et al, 1988, mediante la técnica del papel- sándwich, pudieron observar el proceso de infección de *Eucalyptus globulus* ssp *bicostata* por *Pisolithus tinctorius*.

Dos días después de la inoculación el hongo se adhiere al ápice de la raíz por un crecimiento de hifas entre y dentro de las células del capuchón de la raíz y se dan las primeras evidencias de hinchazón de los tejidos. Una vez dentro del ápice radicular, las hifas se tuercen y se ramifican en un reducido espacio, mientras que las hifas que no terminaron de avanzar y residuos de células del ápice radicular se compactan en una masa de tejido. Las fuerzas generadas por el avance de las hifas y el capuchón externo, le dan al ápice radicular un aspecto hemisférico característico.

A los 4 días todas las estructuras básicas de una típica ectomicorriza se definen, incluido el ápice hinchado rodeado de un escudo denso de hifas y células epidérmicas con algún desarrollo de red de Hartig.

Se observó que el foco inicial de infección es la región del capuchón de la raíz.

Antes de existir las técnicas modernas de cultivos axénicos se creía que el proceso de infección era lento, pero gracias a esta técnica se pudo determinar que no.

El proceso de infección de las micorrizas superficiales e intermedias es similar al de las micorrizas típicas. Sin embargo, estos hongos poseen menos control sobre el ápice radicular. En las micorrizas intermedias se forma una red de Hartig, pero las células epidérmicas no adquieren una forma elongada así como el ápice radicular tampoco se toma hemisférico. Esto sugiere que no se generan las mismas fuerzas intensas que en las micorrizas típicas, no obstante, son suficientes como para modificar las células epidérmicas y permitir que el hongo penetre.

En las micorrizas superficiales no hay formación de red de Hartig, por lo que se presume no hay modificaciones de las células epidérmicas.

La infección de los hongos endomicorríticos no comienza por el ápice radicular, sino por la región justo detrás del mismo (Chilvers, 1968). El proceso es rápido y afecta las células epidérmicas o los pelos radiculares. Una vez alcanzada la corteza, el hongo se expande dentro y entre las células. Luego de un tiempo los arbúsculos comienzan a degradarse y las vesículas se desarrollan también dentro y entre las células.

## **2.5.5- Beneficios de la simbiosis micorrítica**

### *2.5.5.1- Beneficios para el hongo*

Los hongos son organismos heterótrofos y muchos de ellos son saprófitos. Sin embargo, los hongos micorríticos no obtienen el carbono del suelo sino que dependen de la planta para obtener la nutrición carbonada y la fuente de energía (Söderström, 1991).

Existen muchos trabajos para cuantificar los niveles de carbono que son transportados desde la planta hacia el hongo (Harley, 1971; Fogel y Funt, 1983; Vogt et al, 1982 citados por Söderström, 1991).

Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar (1991) encontraron, utilizando  $^{14}\text{CO}_2$ , que los requerimientos en carbono de las VAM son satisfechos a expensas de la fotosíntesis de la planta hospedera y que muchos de los compuestos transferidos a los hongos son rápidamente convertidos en metabolitos específicos suyos.

El crecimiento de los hongos micorríticos influye en la tasa a la cual el huésped recibe nutrientes y también influye en la morfología del sistema radicular y la partición de asimilados en la planta (Sanders et al, 1983).

Según Anderson (1988), existen dos explicaciones acerca del control de crecimiento del hongo, por parte de la planta. Por un lado, se produciría una regulación en el flujo

de carbono desde las células de la planta. Esto sería explicado por el hecho de que el suministro de glucosa de las raíces haría que las hifas se ramificaran extensamente y necrosaran la raíz. Sin embargo, es necesario un cierto nivel de nutriente para que se produzca la asociación. Pérdidas de nutrientes de las raíces son mayores en plantas con mayor potencial de ser micorrizadas.

Graham et al, en 1981 (citado por Anderson, 1988), propusieron que el pasaje de carbono aumenta con la nutrición pobre de fósforo debido a una alteración en la estructura de la plasmalema de la planta. En estas condiciones, el desarrollo de las *micorrizas* pasaría a depender de sí mismas. Al mejorar la nutrición fosforada (por la absorción de las hifas externas), se corrige la estructura de la planta y el control del pasaje de carbono.

Por otro lado, existirían mecanismos de defensa como barreras estructurales, químicas y enzimáticas. Los hongos tuvieron que desarrollar estrategias para sortear estas barreras. El desarrollo de apresorios para la penetración de la epidermis o la tolerancia a la acumulación de fenoles son ejemplos de ello.

#### 2.5.5.2- Beneficios para la planta

Los beneficios de la simbiosis para la planta se pueden agrupar en función del modo de incidencia en la misma: absorción de agua y nutrición mineral, desarrollo y crecimiento, supervivencia, etc.

Las plantas micorrizadas no son solo plantas sin micorrizar con un micelio asociado en sus raíces. Por lo tanto la respuesta a la infección no es fácilmente predecible a partir de las características de las plantas sin micorrizar (Koide, 1991).

Pobres crecimientos de especies de árboles exóticos en suelos forestales son a veces asociados a la ausencia de hongos micorríticos indígenas (Grove et al. , 1991; Jeffries y Dodd, 1991).

Los árboles con abundantes micorrizas tienen un área fisiológicamente activa mucho mayor para la absorción de agua y nutrientes que aquéllos que no están micorrizados o lo están débilmente. La hifa extramatricial funciona como una entidad adicional e incrementa la habilidad del árbol en capturar nutrientes y agua del suelo (Marx, 1991).

Las raíces micorrizadas son capaces de absorber y acumular nitrógeno, fósforo, potasio y calcio más rápido y por períodos más prolongados que las raíces no micorrizadas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). También parece verse incrementada la tolerancia a la sequía, temperaturas del suelo altas, toxinas orgánicas e inorgánicas y valores extremos de acidez causadas por altos niveles de azufre, manganeso o aluminio (Cordell et al. 1987, Marx, 1991).

Un mecanismo por el cual los hongos micorríticos aumentan la absorción de nutrientes es a través de la producción de enzimas en la superficie de las células o enzimas extracelulares. Existe la hipótesis de que estas enzimas pueden solubilizar formas insolubles, inaccesibles para las plantas no micorrizadas (Antibus et al, 1986).

Los mismos investigadores citan la asociación de las micorrizas con la materia orgánica e intuyen que el fósforo puede ser obtenido enzimáticamente a partir de formas orgánicas.

Marx y Krupa (1978) encontraron que las ectomicorrizas impiden infecciones por patógenos como *Pythium* y *Phytophthora*.

Las relaciones hormonales que se establecen entre las plantas y las micorrizas causan que las raíces sean fisiológicamente más activas por más tiempo.

Smith y Gianinazzi-Pearson (1988) citan que la acumulación de hormonas en tejidos es afectada por la infección micorrítica, con cambios en los niveles de citoquininas, ácido abscísico y giberelinas.

La tasa fotosintética es normalmente mayor en plantas micorrizadas. Estudios recientes (Beever, 1980, citado por Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), en los cuales se comparan plantas micorrizadas y no micorrizadas (fertilizadas con fósforo), muestran efectos no nutritivos del hongo sobre la planta. Se pone de manifiesto una mayor eficiencia en el uso de fósforo en el proceso fotosintético en plantas micorrizadas. Esto es posiblemente debido a una inducción en la planta, por parte de la micorriza, en la formación de compuestos que influyen en la estructura y/o función de los cloroplastos, entre los cuales podrían estar implicadas las fitohormonas.

Evidencias de experimentos con  $P^{12}$  en suelos indican que el mecanismo de la influencia de las VAM es primero físico, siendo que las hifas se extienden como pelos radicales.

### 2.5.5.3- La simbiosis en la nutrición mineral

La calidad y la performance de las plantas son gobernadas por procesos que ocurren bajo el suelo, en la zona cercana a las raíces. La absorción de agua y de nutrientes está en función del crecimiento de los ápices radiculares o raíces activas (Cordell et al, 1987).

#### 2.5.5.3.1- Nutrición fosforada

Uno de las derivaciones más estudiadas de la simbiosis micorrítica es el efecto en la absorción de fósforo.

El ión fosfato tiene un lento coeficiente de difusión en el suelo. Incluso la difusión hacia la superficie de la raíz es siempre más lenta que la tasa de absorción necesaria para mantener al máximo la tasa de crecimiento de la planta. Es de esperar que especies con alta densidad de largo de raíz ( $cm/cm^3$ ), absorban más fósforo que aquéllas con menores densidades, debido a que esta variable determina cuán lejos el ión fosfato deberá difundir en el suelo (Koide, 1991).

Experimentos llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que las VAM, por medio de sus hifas externas, pueden absorber el fosfato soluble y transportarlo a través de distancias relativamente largas a los tejidos de la raíz. De esta forma, el micelio profusamente ramificado, además de incrementar el número de sitios de absorción, permite explorar un volumen de suelo mucho mayor (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991; Díaz y Honrubia, 1993).

El fósforo es transportado, luego, vía apresorios hacia el hongo VA dentro del cortex y vía arbusculos hacia la planta. Estos sistemas de bypasses traen efectos físicos directos en la absorción de fósforo que estaría limitada a los iones de la superficie radicular. Este mecanismo físico dejaría de tener importancia si los niveles de fósforo son suficientes y cuando efectos no nutricionales de las VAM están implicados. Sin embargo, si el suelo es fijador de fósforo las plantas van a responder a la inoculación con VAM, aún cuando se haya fertilizado previamente (Hayman, 1982).

El flujo de fósforo desde el suelo hacia las raíces de las plantas micorrizadas es más rápido que en las no micorrizadas (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). En suelos de bajo contenido de fósforo este flujo se ve incrementado así como la concentración de este elemento en los tejidos, al menos en las primeras etapas de crecimiento. Un mecanismo que explique estos resultados es la eficiencia con la que las raíces pueden explorar el suelo, con las hifas extendiéndose más allá de la zona de deficiencia.

La modificación de las propiedades de absorción de nutrientes de las raíces depende de: - el desarrollo de las hifas extramatriciales en el suelo; - absorción de las hifas de fósforo; - traslocación del fósforo a través de las hifas a lo largo de grandes distancias; - transferencia del fósforo desde el hongo hacia la planta (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

La infección de las micorrizas puede alterar el déficit de fósforo y/o su eficiencia de utilización independientemente de su efecto directo en la absorción del elemento. Por ejemplo, la infección puede al mismo tiempo aumentar la tasa de acumulación de fósforo más allá de lo que pueda ser usado para el crecimiento, reduciendo la eficiencia de uso del fósforo corriente.

Este momentáneo consumo de lujo de fósforo puede, sin embargo, servir como un almacenamiento y ser usada subsecuentemente, permitiendo a las plantas micorrizadas superar a las que no lo están.

De igual forma, la infección micorrítica puede alterar el abastecimiento de fósforo. A pesar de causar un aumento en el flujo de fósforo, la infección puede tener un efecto menor al deseado debido a disminuye el largo de las raíces. Un aumento en el nivel de fósforo reduce la formación de pelos radiculares (Fohse y Jungk, 1983, citado por Koide, 1991).

Bowen, Bevege y Mosse (1975; citado por Koide, 1991), encontraron que la infección micorrítica podía aumentar la longevidad de las raíces, las cuales podrían aumentar la eficiencia con la cual usar los recursos. También puede alterar el suministro de fósforo al aumentar la actividad de las fosfatasas alcalinas en las raíces y en la rizósfera o por reducir la actividad de las fosfatasas ácidas.

La eficiencia de utilización del fósforo se ve también afectada (Koide, 1991). Se cita que, dado un determinado peso seco, las plantas micorrizadas tienen mayores contenidos de fósforo que las testigos. Esto sugiere que dichas plantas son menos eficientes en la producción de materia seca, pero esta reducción podría deberse a un desplazamiento temporal de la adquisición de fósforo para el crecimiento.

#### 2.5.5.3.2- Nutrición nitrogenada:

En diversos experimentos se han puesto de manifiesto incrementos en la concentración de nitrógeno en planta, como consecuencia de la formación de micorrizas VA (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991).

Esto puede ser explicado por efectos directos, incrementando la captación de compuestos nitrogenados a partir del suelo mediante las hifas externas, e indirectos, mediados por la estimulación de la fijación biológica de  $N_2$  (FBN).

El efecto sobre la FBN parece ejercerse, fundamentalmente, a través de la mejora en la nutrición fosforada ya que este es un proceso que requiere mucha energía, con gran consumo de ATP. Sin embargo, no se debe descartar la influencia de las micorrizas en la captación de otros nutrientes involucrados en la FBN, como el Fe y el Mo (Hayman, 1983; Rai, 1988).

#### 2.5.5.3.3- Otros nutrientes:

Tinker (1983, citado por Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), cita que las VAM incrementan la concentración foliar de Zn y Cu, independientemente del efecto mediado por la superación del estrés de fósforo.

En general, los efectos directos de la simbiosis micorrítica sobre la nutrición mineral están limitados a aquellos nutrientes que son poco móviles y están presentes en bajas concentraciones en la solución del suelo. Tal es el caso de P,  $NH_4$ , K, Zn y Cu. Debido a la mayor movilidad de iones tales como nitratos o sulfatos, no es probable que se formen zonas de depleción alrededor de las raíces y probablemente estos iones no se muevan más rápidamente a través de las hifas que de la solución del suelo.

### **2.5.6- Factores que afectan la simbiosis micorrítica**

Los principales factores que afectan la simbiosis micorrítica se resumen en problemas en la ineficiencia de la inoculación del hongo, problemas de incompatibilidad entre hongo y planta, deficiencias o excesos de nutrientes y características del sustrato o suelo.

El primer requisito para el desarrollo de la micorriza es que la planta sea susceptible, segundo, que el inóculo viable debe estar cerca del rizoplaneo y tercero, que las condiciones químicas, físicas y biológicas del suelo deben favorecer la colonización (Marx, 1991).

Mecanismos de incompatibilidad pueden ocurrir en cada etapa del ciclo del hongo. La presencia de toxinas en las plantas o la falta de nutrientes en las exudaciones pueden limitar la germinación, así como la ausencia de reconocimiento de estructuras en la superficie de las raíces puede limitar la adhesión. Sin embargo, estudios indican que la incompatibilidad se produce luego de la germinación, adhesión y penetración del hongo. Estos estudios incluyen interacciones de hongos ectomicorríticos con coníferas y eucaliptos, hongos VA con crucíferas y ericoides con plantas no hospederas (Anderson, 1988).

La penetración de los hongos en la epidermis o en los tejidos corticales de la planta es regulada por barreras químicas o estructurales que pueden ser preformadas o inducidas en el cambio. La lignificación de la endodermis también sirve para detener la penetración más allá del cortex. Suberización de las células epidérmicas, como una barrera preformada en VAM, fue observada en raíces de edad (Anderson, 1988).

Molina y Trappe; Malajczuk et al (Anderson, 1988), reportan acumulación de fenoles en coníferas y eucaliptos como otra barrera a la infección en asociaciones incompatibles. Bonfante-Fasolo (Anderson, 1988) observó necrosis en plantas no huéspedes en contacto con ericoides. Estas respuestas se parecen a las reacciones de hipersensibilidad, mecanismo contra patógenos.

Lapeyrie y Bruchet (1985), encontraron que uno de los factores que limitan los experimentos en búsqueda de aplicaciones para los hongos micorríticos es el fracaso en la infección dado que la misma depende de muchos factores, como el tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes minerales, intensidad lumínica, y microorganismos del suelo.

Según Marx (1991), el potencial fotosintético del árbol y la fertilidad del suelo son los factores más influyentes en la susceptibilidad de las raíces frente a una infección. Alta intensidad luminosa y una fertilidad baja a moderada promueven el desarrollo fúngico; una intensidad 20% por debajo del máximo de luminosidad y una fertilidad excesiva reducen la infección.

En la síntesis *in vitro* de micorriza se observó que el uso de turba/vermiculita no permitió un buen desarrollo del micelio fúngico, el cual no logró invadir la zona radical a pesar del buen desarrollo de las plántulas. Al utilizar vermiculita sola y/o papel filtro como soportes, las condiciones fueron apropiadas para la síntesis micorrítica. El uso de vermiculita presentó el inconveniente de que la misma quedó adherida a las raíces lo que dificultó la observación. El papel filtro presentó la ventaja adicional de permitir la visualización directa de las micorrizas y se facilitó la renovación del medio nutritivo.

La inoculación de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* en el momento del repique al medio de enraizamiento, originó un abundante crecimiento superficial del hongo el cual inhibió el desarrollo y la rizogénesis de los explantos. El micelio no se desarrolló en el interior del medio de cultivo, debido posiblemente a la falta de oxígeno (Malvárez et al, 1997).

Estos resultados contrastan con lo encontrado por Malajczuk y Hartney (1986) quienes obtuvieron mayores porcentajes de micorrización de *Eucalyptus camaldulensis* por *Pisolithus in vitro* que en macetas. Según estos autores el éxito se debió a que los hongos no presentaron competencia y/o antagonismo por estar en condiciones de ascepcia. En contraste se vieron menores resultados en maceta tal vez por el lavado o por la existencia de inhibidores presentes en el medio.

Es importante la influencia que ejerce el sustrato en la efectividad de la simbiosis. Se sabe que ciertas características del suelo (pH, textura, fertilidad, temperaturas extremas, humedad, microflora, etc.) pueden influir en el comportamiento de los diferentes endófitos (Marx, 1991; Díaz y Honrubia, 1993).

La solubilidad de los nutrientes del suelo y la nutrición de las plantas pueden ser alteradas por cambios en el pH. El pH del suelo influye en la solubilidad de P así como también de otros nutrientes como Fe, Mn, Cu, Zn, y niveles tóxicos de Al.

Suelos con un pobre drenaje y en estado de saturación por largos períodos disminuyen la eficiencia de la infección micorrítica (Safir y Duniway, 1982).

En suelos pobres y marginales donde tanto plantas como endófitos se han adaptado a las condiciones de estrés, las micorrizas presentan una pobre tolerancia al agregado de nutrientes y aumento de fertilidad.

Cambios en la fertilidad del suelo debido al agregado de fertilizantes minerales y materia orgánica afectan marcadamente la actividad de la población micorrítica en términos de la cantidad de infecciones y número de esporas restantes producidas (Hayman, 1982).

Según este autor, una alta disponibilidad de nutrientes minerales, particularmente el N pueden reducir y hasta inhibir el desarrollo micorrítico.

Wallander y Nylund (1991) encontraron que la producción de esporocarpos de hongos ectomicorríticos se vieron fuertemente reducidos en plantaciones de pinos luego de una fertilización con N o deposición de N atmosférico.

La disminución de la biomasa de los cuerpos de fructificaciones puede ser consecuencia de una disminución de simbiosis y es precedida por una disminución de

la producción de micelio extramatricial. La reducción resultante de grandes deposiciones de N reduce el potencial del hongo para absorber minerales y agua y transferirlos dentro del árbol. Muchos autores concluyeron que el nitrato tiene un fuerte efecto inhibitorio así como el amonio.

Meyer (1962, citado por Wallander y Nylund, 1991) demostró que agregados de N no disminuían la frecuencia de micorrizas en suelos ricos en nutrientes, mientras que en suelos pobres la infección era suprimida. También concluyeron que el efecto inhibitorio del N, se producía por mecanismos indirectos.

Johnson y Hummel (1986, citados por Arines, 1991) encontraron que el nivel de colonización de los hongos VA aumenta con el contenido de montmorillonita en el sustrato. Esto es debido a que se produce un aumento de pH, contenido de sales, capacidad de intercambio catiónico, densidad y capacidad de retención de agua, y de un descenso del espacio libre y del P soluble en agua.

Frecuentemente se cita que la eficacia de VAM depende del nivel de P en el suelo y que no son de esperar efectos positivos a niveles altos de P asimilable. Teniendo en cuenta que en la mayoría de los experimentos con VAM se realizan con suelo esterilizado, quizás se esté sobrestimando el efecto del P sobre la infección. Este hecho puede ser también consecuencia de que la esterilización del suelo modifica la distribución del fosfato en el suelo, en el sentido de que hay un desplazamiento del P orgánico hacia las formas inorgánicas. Esto no contradice el hecho de que la planta obtenga un mayor beneficio de la VAM cuando el nivel de P asimilable es bajo.

Se han planteado razones adicionales. Las hifas crecen paralelas a la raíz y los pelos radiculares lo hacen perpendicularmente. Aún asumiendo que la cinética de absorción sea similar, este hecho se traduce en que el gradiente de P en sentido normal a la hifa es plano, mientras que con respecto al pelo radicular es variable, descendiendo la concentración al acercarse a la superficie. Esto implica que la absorción de P por unidad de superficie es mayor en el caso de la hifa, lo que le permite ser más eficaz. Esto está de acuerdo con los resultados de Cress et al, 1979, quienes demuestran que las hifas tienen mayor afinidad por el ión fosfato cuando la concentración de éste es baja. También es posible que las plantas micorrizadas puedan usar formas orgánicas de P mediante hidrólisis más activa del fitato (Arines, 1991).

Grove et al (1991) encontraron que el desarrollo de ectomicorrizas y las respuestas de crecimiento de *E.globulus* a la inoculación fueron marcadamente afectadas por el suministro de fósforo. Las plantas inoculadas tuvieron significativamente una mayor biomasa. Sin embargo, no hay interacción entre los efectos del agregado de fósforo y los diferentes hongos utilizados. Esta ausencia de interacción sugiere que hay otros factores además del aumento de absorción de fósforo en la respuesta del crecimiento a la inoculación. Una posibilidad es el resultado de una mayor traslocación de carbono inicial hacia las raíces lo que les permite su crecimiento durante períodos de sequía y calor.

Los investigadores concluyeron que el suministro externo de fósforo es solo uno de los factores que determinan la efectividad de los aislamientos específicos en formar las

ectomicorrizas y potenciar el crecimiento de las plantas. Mediciones de otros factores y su influencia (temperatura del suelo, pH, suministro externo de N) y la cuantificación de las características de los hongos (grado de especificidad de hongo/planta, morfología, desarrollo externo de hifas) pueden servir para determinar su efectividad en el aumento de absorción de fósforo y su crecimiento, si se quiere determinar una predicción de la performance de un hongo específico en el campo basándose en su comportamiento en invernáculo y para adaptar prácticas de vivero para tener una producción de plantas micorrizadas.

La absorción de P también está afectada por otros factores como pH, contenido de oxígeno, temperatura y concentraciones de P en solución (Kropp y Langlois, 1990).

Variables ambientales también determinan el abastecimiento de P, directamente en su influencia en la concentración de fosfato en el suelo y la tasa de difusión o indirectamente por su influencia en rasgos de las plantas. El contenido de agua en el suelo afecta la tasa de transporte del fosfato hacia la superficie de la raíz al afectar la tasa de difusión.

Aproximadamente 99% del abastecimiento del P es dado vía difusión más que por flujo de masa. La difusión del fosfato se ve disminuida en la medida que el suelo se seca debido a que la sección efectiva del área llena de agua disminuye y los pasajes del agua se vuelven tortuosos. El contenido de agua del suelo puede también afectar la absorción de fosfatos influyendo la tasa de extensión de las raíces vía su efecto de corte del largo y por la turgencia de las raíces.

Para que la concentración del fosfato en el suelo se mantenga constante, la tasa de absorción debe ser proporcional a la tasa de acumulación de materia seca.

En suelos con deficiencias extremas de P, solo una lenta tasa de crecimiento es admisible si se quiere mantener constante la concentración de P (Koide, 1991).

Sanders (1975 citado por Miranda et al, 1989) sugirió dos posibilidades por las cuales la fertilización fosfatada puede reducir la infección de las raíces por VAM. Por un lado, el P del suelo tiene un efecto inhibitorio directo en el crecimiento externo de las hifas y por otro lado un efecto indirecto asociado con el nivel de P en planta

Bajo condiciones de baja nutrición fosfatada, el bajo contenido de P en planta puede correlacionarse con descenso de niveles de fosfolípidos y un aumento de la permeabilidad de la membrana favoreciendo la infección micorrítica. En condiciones de suficiente P una reducción de la permeabilidad de la membrana ocurre, resultando en un descenso en el pasaje de metabolitos requeridos para iniciar la infección.

El fósforo es clave en la biología de las plantas, participando en la mayoría de los procesos metabólicos, así como componente estructural de muchos bioquímicos como ácidos nucleicos, co-enzimas, fosfoproteínas y fosfolípidos. En consecuencia tanto plantas como microorganismos del suelo compiten por el P en los magros niveles de ortofosfato mantenido en solución en el suelo por procesos químicos de precipitación-solubilización y adsorción-desorción (Tate, 1984).

Menge et al (1978) concluyeron que la dependencia micorrítica no siempre puede ser medida en función del nivel de P en el suelo o sus concentraciones en los tejidos.

Otros nutrientes pueden alterar sustancialmente la dependencia micorrítica. Hall, (1975 citado por Menge et al, 1978) mostró que adiciones de Ca, N, Fe, Zn y Cu podían alterar la dependencia.

### **2.5.7- Producción de inóculo y técnicas de inoculación**

La primera etapa en un programa de inoculación de hongos micorríticos es la elección de la especie. Es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones acerca de las cualidades y requisitos que debe cumplir (Marx y Kenney, 1982; Marx, 1991):

- Deben presentar especificidad con las plantas huéspedes.
- Deben presentar amplio rango de huéspedes.
- Los aislamientos provenientes de distintas especies de árboles y regiones deben ser testados para determinar cuanta variación genética existe entre aislamientos.
- Los hongos micorríticos elegidos deben tener la habilidad de crecer rápidamente en cultivos puros y ser capaces de soportar las manipulaciones físicas, químicas y biológicas.
- Debe sobrevivir como mínimo entre 4 a 6 semanas entre la inoculación y el desarrollo de raicillas por parte de la planta. En forma ideal el inóculo debe ser capaz de sobrevivir en almacenaje varias semanas antes de su uso.
- Deben tener capacidad de adaptación ecológica a los distintos tipos de sitios en que se plantarán los huéspedes. Los cambios ambientales que deben soportar son extremos en suelo y clima, organismos antagonistas, aplicaciones de pesticidas, alteraciones físicas del micelio por prácticas.
- Otra característica deseada es la producción de cordones miceliarios o esclerotos que permitan la absorción de nutrientes y agua en períodos de estrés y permitan mantener el potencial del hongo.

A pesar que el efecto del inóculo es breve, hasta que es suplantado por otro hongo, los beneficios del mismo pueden hacer la diferencia entre la muerte y la supervivencia de las plantas.

Un problema que puede surgir es que el hongo crezca vegetativamente durante períodos prolongados en medio artificial, en ausencia de sustancias esenciales y sin una frecuente asociación con los tejidos de plantas susceptibles. Estas condiciones de crecimiento pueden cambiar los sistemas de enzimas adaptativas y disminuir la capacidad de infección. Los hongos ectomicorríticos usan enzimas específicas para infectar los tejidos vegetales y muchos pierden su capacidad de formar micorrizas luego de mucho tiempo en medio artificial (Marx y Daniel 1976 citado por Marx, 1991). Tal vez un frecuente pasaje por plantas huéspedes pueda revitalizar viejos cultivos que hayan perdido su capacidad simbiótica. También permiten mantener la vitalidad de los aislamientos.

Laiho (1970 citado por Marx, 1991) encontró que algunos aislamientos de *Paxillus involutus* perdían su capacidad de formar ectomicorrizas solo después de muchos años

en cultivos artificiales. Melin, 1936; Trappe, 1977; Gobl, 1975 (citados por Marx, 1991), enfatizaron la necesidad del uso de aislamientos frescos (recientemente obtenidos en cultivos puros) y de testear varios aislamientos antes de decidir sobre los méritos de las especies de hongos en estudio.

Marx (1991) sugiere que una revitalización, vía pasaje por planta huésped, debe hacerse cada 4 años para mantener alto el potencial simbiótico de aislamientos específicos.

#### 2.5.7.1- Producción de inóculo ectomicorrítico

Existen varios tipos de inóculos y en función de ellos se desarrollan diferentes técnicas de preparación.

El inóculo utilizado más ampliamente es el suelo o humus colectado de plantaciones ya establecidas (Kropp y Langlois, 1990; Jeffries y Dodd, 1991; Marx, 1991). El mayor problema de este tipo de inóculo es que no se conoce la composición de los hongos.

Otra fuente de inóculo muy utilizada son las esporas. Éstas presentan la ventaja de mantener su viabilidad en almacenaje de una estación a otra.

El uso de esporas como inóculo se ha usado mucho porque es barato y fácil de manipular. Puede ser usada en riegos, en las semillas o al momento del laboreo. Sin embargo las esporas son menos efectivas que el inóculo sólido y requieren grandes cantidades de esporas. Algunos hongos como *Pisolithus* y *Rhizopogon* son capaces de producir esporas en grandes volúmenes.

La ubicación de un vivero cerca del área de plantación puede beneficiar la inoculación por esporas a partir de las fructificaciones de alrededor de la plantación. Sin embargo estudios de inoculaciones naturales demuestran que éstas varían año tras año y es irregularmente distribuida en los viveros (Kropp y Langlois, 1990).

En Estados Unidos se usaron basidiosporas de *Pisolithus*, *Rhizopogon vinicolor* y *R.colossus* en producción a gran escala. Las esporas eran efectivas en varias formas: 1) mezcladas con arena, turba o vermiculita antes de llevarlas al suelo, 2) suspendidas en agua, 3) en polvo, 4) peleteadas, 5) encapsuladas, 6) incorporadas en hidrocoloides (Marx, 1991).

En Filipinas se han desarrollado técnicas de preparación comercial de inóculo basado en basidiosporas de *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma* para la inoculación de *Pinus* y *Eucalyptus*. Las basidiosporas son removidas de los basidiocarpos y pelletizados en arcilla. La concentración de esporas en cada *pellet* es de 9-10%. Cada *pellet* es agregado en una maceta cuando las plántulas son transplantadas en forma individual en el vivero. Diferencias significativas en peso y diámetro se encontraron en plántulas de *Pinus caribaea*, *Eucalyptus camaldulensis* y *E.deglupta* tres meses después. *E.deglupta* presentó incrementos de 64% en peso y 73% en diámetro de tallo luego de 18 meses a campo frente a los controles sin inocular. Similares resultados se obtuvieron con plántulas de *Pinus caribaea*, luego de 16 meses a campo (incrementos de 45% en peso y en diámetro de tallo). Cuando se determinaron las curvas de

respuesta a diferentes dosis de fósforo se observó que la inoculación de plántulas en vivero podía sustituir entre 67% y 86% de la fertilización con P inorgánico equivalente necesaria para obtener una respuesta similar. Ensayos a campo demostraron que en suelos no estériles, la población indígena de hongos no era capaz de lograr resultados tan espectaculares como los inoculados. El mayor problema es la variabilidad en el abastecimiento de esporas. Su colecta está limitada a la época de fructificación y la variabilidad genética es introducida al coleccionar micelio de diferentes áreas geográficas (Jeffries y Dodd, 1991).

El inóculo en forma de micelio es también recomendado. Recientemente su producción a gran escala se vio trabado por la dificultad de obtener volúmenes para plantaciones de millones de plantas (Marx, 1991).

Se han desarrollado muchos métodos para producir un inóculo constituido por micelio puro el cual puede ser transportado en agar, turba, granos de cereales, o en mezclas como vermiculita/ turba. Es fácil producir suficiente inóculo de esta manera para estudios de investigación, pero se dificulta para una producción a gran escala (Lapeyrie y Bruchet, 1985; Le Tacon et al, 1985).

Sin embargo, Marx et al. (1982,1984 citado por Le Tacon et al, 1985) mostraron que inóculo viable de *Pisolithus tinctorius* desarrollado en un sustrato de vermiculita, turba y nutrientes podía ser producido a gran escala en fermentadores.

Al colocar el micelio en geles de polímeros y luego agregar arcilla a los mismos, se produce un inóculo muy apto para la inoculación en forestación. Los microgránulos sólidos son más fáciles de manipular en vivero.

Con la técnica de producción en un fermentador seguido por la inclusión en geles de polímeros se reduce el tiempo de inoculación, pudiendo realizarla con micelios de solo una a dos semanas de vida. Con el antiguo método en vermiculita, turba y nutrientes el inóculo presenta dos meses de vida. La efectividad de este método en términos de crecimiento de las plantas es probablemente debido a la mayor actividad metabólica del joven micelio. Si la inoculación se realiza al momento de la siembra, las plántulas son receptivas al inóculo 2 a 3 meses después, con lo que el micelio deberá vivir saprofiticamente. El micelio encontrará mejores condiciones de supervivencia dentro de las redes de los geles que dentro de las estructuras de la vermiculita. Se verá protegido contra el estrés hídrico y otros microorganismos.

Según Da Cruz Pradella et al (1990), el crecimiento de cepas de los hongos en tanques fermentadores giratorios es una opción razonable de producción de inóculo a gran escala. Esta técnica provee las mejores condiciones ambientales para el crecimiento axénico de altas concentraciones de células en poco tiempo para obtener el control de calidad del micelio.

Jeffries y Dodd (1991) citan la producción de micelio macerado en cámaras de crecimiento de laboratorio. Esta técnica, sin embargo, requiere tiempo, espacio e infraestructura adecuada de modo de evitar posibles contaminaciones.

Existen además otros tipos de inóculos no convencionales. Mullette (1976) cita al licuado de estructuras reproductivas de *Pisolithus* como un excelente inóculo y estudios en Francia observaron que hifas encapsuladas en alginatos eran muy eficientes como fuente de inóculo (Kropp y Langlois, 1990).

Es importante tener en cuenta el almacenamiento del inóculo. Puede hacerse a bajas temperaturas, pero la retención de la viabilidad varía según la especie del hongo y debería ser chequeada para cada caso.

La supervivencia a temperatura ambiente es limitada. Es importante que el inóculo sea aplicado de forma tal que interaccione rápidamente con el sistema radicular de la planta.

En el caso de que el micelio se desarrolle en un caldo es necesario agitarlo antes de ser usado y para que sea más efectivo debe guardarse en un medio pobre en nutrientes, obteniéndose un mayor inóculo potencial (Lapeyrie y Bruchet, 1985).

*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker y Couch es un hongo con potencial para aplicaciones en programas forestales.

Es una herramienta biológica para mejorar la supervivencia y desarrollo de muchas especies en sitios pobres debido a su eficacia, facilidad de manipulación, amplio rango de huéspedes y geográfico así como efectos comprobados en los huéspedes.

Presenta muchas cualidades que lo hacen apto para una aplicación práctica. Puede ser fácilmente propagado en el laboratorio en medios líquidos y/o sólidos. Su coloración mostaza permite una fácil identificación y conteo en las raíces. En cultivo puro *Pisolithus* puede crecer a temperaturas entre 40 y 42°C y crece más rápido entre 28 a 30°C. El punto térmico de muerte de las hifas es 45°C.

Se ha usado con éxito en experimentos como inóculo en suelos fumigados de pinos, robles y pecanes (Marx et al, 1982).

*Pisolithus* es una especie que forma micorrizas *in vitro* con muchos géneros de árboles. La formación es rápida con un típico manto sobre la raíz y formación de red de Hartig. Las raíces micorrizadas son simples, sin ramificaciones, sin pelos radicales y con diámetros más grandes comparados con raíces sin micorrizar.

Además es capaz de crecer bien y formar micorrizas a temperaturas relativamente altas comparado con otros hongos sugeridos como candidatos para las inoculaciones. El éxito en climas templados es mayor cuando las estaciones son secas.

La inoculación *in vitro* da más uniformidad a la formación de micorrizas que al hacerlo *in vivo*. Sin embargo, retarda el crecimiento de los brotes de las plantas micropropagadas causando una disminución del número de hojas (Tonkin et al, 1988).

Como *Pisolithus tinctorius* y otros hongos presentan gran variación, los aislamientos provenientes de diferentes fuentes de variación potencial deben ser examinados antes de evaluar el potencial simbiótico de cualquier especie de hongo.

En Inglaterra se usa comercialmente mezclas de cuatro hongos, *Thelephora terrestris*, *Paxillus involutus*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustuliniforme* (Jeffries y Dodd, 1991).

### 2.5.7.2-Producción de inóculo endomicorrítico

Los hongos endomicorríticos son biotrofos obligados, es decir, dependen para su desarrollo y reproducción de productos de la planta completa o de la raíz, una vez manipulada ésta para su crecimiento meristemático (Sieverding y Barea, 1991).

Tanto las esporas como micelio externo o ubicado dentro de la raíz son fuentes de inóculos. Las fuentes más comunes son, en general, trozos de raíces y sustratos colonizados (Sieverding y Barea, 1991).

Un sustrato en el que se desarrolló la simbiosis endomicorrítica suele quedar enriquecido en propágulos. Es conocido que estos sustratos tienen alta infectividad, pudiendo formar micorizas en uno o dos días. Este tipo de inóculo ha sido empleado desde los primeros intentos del uso práctico de los hongos endomicorríticos, puesto que no requiere de mucha manipulación. Los portadores más utilizados son suelos naturales esterilizados de diversas texturas, con diferentes contenidos en materia orgánica, etc. Actualmente se utilizan sustratos menos pesados como turba o arcillas expandidas (Sieverding y Barea, 1991).

En el caso de los hongos endomicorríticos, las esporas germinan *in vitro* en agar, pero el crecimiento de las hifas es restringido a unos centímetros, con un rango de sustancias orgánicas, vitaminas, y componentes sulfurosos promotores del crecimiento. La presencia de raíces o células en suspensión es también notoria, pero el crecimiento se detiene si la espora es removida. El agotamiento de las reservas de las esporas no es probablemente el responsable del pobre o de la interrupción del crecimiento. Existen mecanismos bioquímicos que bloquearían el desarrollo *in vitro* de estos hongos (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988).

Las raíces colonizadas son un inóculo superior a las esporas ya que solo tardan dos días en colonizar nuevas raíces. Las cantidades de raíces aplicadas en viveros varían entre 2 a 20grs de raíces frescas por planta.

Generalmente se recolectaban las raíces del campo, pero ante el desconocimiento de la especie del hongo implicado y el riesgo de portar agentes patógenos es preferible usar material obtenido de cultivos en macetas (Sieverding y Barea, 1991).

Recientemente, se lograron micorizar cultivos de raíces, posibilitando la fabricación axénica de inóculo. Sin embargo, los costos de producción son altos.

El progreso en la elaboración de un inóculo comercial de hongos endomicorríticos se ha visto retrasado por la incapacidad de los mismos a crecer en medio axénico. Todos los sistemas actuales con cultivos incluyen más de un huésped.

El inóculo es producido usando el sistema convencional de macetas, una conteniendo las esporas de los hongos y otra con raíces infectadas de plantas que crecieron en un medio esterilizado y en containers tratados con fungicidas.

Sieverding (1986 citado por Jeffries y Dodd, 1991) discutió sobre la necesidad de un banco de germoplasma de hongos endomicorríticos como un requerimiento básico para una investigación a largo plazo.

Varios investigadores han implementado un interesante sistema de desarrollo hidropónico como medio de transporte para la producción de inóculo VAM (Jeffries y Dodd, 1991).

También se han desarrollado otros soportes para el inóculo endomicorrítico. Es el caso de composts y las arcillas expandidas. El primer ejemplo tiene muy poco uso comercial mientras que las arcillas cuentan con gran desarrollo. Con esta técnica se logró reproducir hongos endomicorríticos que esporularon dentro de las partículas porosas de las arcillas. Lamentablemente pocas variedades de arcillas expandidas son útiles. En comparación con otros inóculos, éste tiene una serie de ventajas: se puede producir el inóculo industrialmente en un tiempo relativamente corto; después de su producción se puede descontaminar selectivamente con fungicidas o alcohol; la supervivencia de los hongos es excelente; el producto es relativamente liviano, por lo que su distribución no presenta problemas; el producto es granular con tamaño similar al de los fertilizantes inorgánicos con lo que puede ser aplicado con maquinaria (Sieverding y Barea, 1991).

A pesar de que la tecnología necesaria para la producción de inóculo y la inoculación es posible y es usada en ciertos cultivos y plantaciones forestales no siempre la inoculación artificial es factible. Para la mayoría de las especies forestales la deficiencia de fósforo puede ser subsanada con la fertilización. Sin embargo es recomendable inocular si las deficiencias y consecuente descenso de la calidad de las plantas persisten aún cuando se fertilice, se hagan rotaciones de cultivos o se fumigue (Cordell et al, 1987).

En el uso de la micropropagación como medio de producción de plantas hay que tener en cuenta una serie de complicaciones adicionales. El problema más significativo es la pérdida de plantas al momento de trasplante. En muchos casos, esta dificultad no se corrige con una fertilización del sustrato. La poca funcionalidad de las raíces desarrolladas *in vitro* implica una ineficiencia en la captación de agua y nutrientes. Las micorrizas, como componentes integrales de la raíz, serían una alternativa para subsanar estas deficiencias.

Para poder implementar este sistema de producción, es necesario investigar acerca del grado de incidencia que las micorrizas tienen sobre el desarrollo y la supervivencia al trasplante de las plantas micropropagadas.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1- MATERIAL VEGETAL Y MÉTODO DE PROPAGACIÓN**

El material vegetal consistió en el clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* (Hill) ex Maiden, seleccionado por el Programa de Mejoramiento Genético Forestal, procedente de Villas Boas en el departamento de Durazno. El mismo fue introducido in vitro por el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, a partir de yemas epicórmicas.

En la micropropagación del clon se continuó repicando el material vegetal introducido y para las etapas de multiplicación, elongación y enraizamiento se ajustó la metodología preconizada por Major *et al.* (1995).

Se realizaron cinco repiques en la multiplicación del material vegetal.

El medio de multiplicación consistió en: a- el medio mineral Murahige y Skoog (MS) (1962) (ver en el anexo); b- vitaminas (MS) para *Eucalyptus*: tiamina (0.2 mg/l), mioinositol (100 mg/l), piridoxina (1 mg/l) y ácido nicotínico (1 mg/l); c-sacarosa (3%); d- agar (0.7%); d- reguladores de crecimiento BAP (0,5 mg/l) y ANA (0,05 mg/l).

El medio de mantenimiento o elongación tuvo la misma preparación salvo las hormonas de crecimiento, las cuales fueron sustituidas por AIB (0,5 mg/l) y BAP (0,1 mg/l).

Los medios se colocaron en tubos de ensayo y frascos (solo el medio de mantenimiento) y se autoclavaron previo ajuste de pH a 5,9.

Cuando los explantos alcanzaron un tamaño de 2 cm como mínimo se repicaron a un medio de enraizamiento.

El enraizamiento constó de dos etapas. Primero se colocaron los explantos en un medio con hormonas que consistió en sales MS reducidas a un tercio, tiamina (10 mg/l) como única fuente de vitaminas, sacarosa (2%), agar (0.7%) y AIB (1mg/l). Se dejaron durante siete días en la oscuridad. Posteriormente se repicaron a un medio igual al anterior pero sin hormonas.

En todos los ensayos, los cultivos fueron mantenidos bajo un fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad (1000 lux) a 25°C.

#### **3.2- FUENTES DE INÓCULO**

Inóculo endomicorrítico: Se emplearon propágulos de hongos endomicorríticos vesículo-arbusculares provenientes de una plantación de *Eucalyptus*, multiplicados con tres huéspedes: cebolla (*Allium* sp.) en dos oportunidades y *Eucalyptus* en otra.

El inóculo consistió en una mezcla de los tres. Al momento del transplante, se colocaron 5 gr de la mezcla conteniendo esporas de los hongos.

Inóculo ectomicorrítico: Los hongos ectomicorríticos fueron los siguientes: - *Cenococcum graniforme* (C<sub>2</sub>) proveniente de la colección del Laboratorio de Micorrizas UFSC, Florianópolis, Brasil.

-*Pisolithus tinctorius* (Pt<sub>23</sub>) proveniente de la colección de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Agronomía.

El inóculo consistió en 1ml de licuado de micelio de los hongos.

Para la reproducción de los mismos se siguió la metodología de Molina y Palmer (1982).

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo de los hongos es el Melin Norkans Modificado (MNM):

CaCl <sub>2</sub> (Ca <sub>3</sub> )	5 gr/l
NaCl (Na <sub>3</sub> )	25 gr/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (K <sub>3</sub> )	50 gr/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 gr/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15 gr/l
EDTA Irom III Sales de Na	2 gr/l
HCl tiamina	0,1 gr/l

Se usan 10 ml de cada solución por cada litro de medio.

Extracto de malta	3gr
Glucosa	10gr
Agua destilada	1000ml
Agar	15%
PH	5,8

El medio fue dispensado en matraces con una dilución de 1/20 para los tratamientos con inóculo y 1/40 para los testigos. Posteriormente se autoclavó 20 minutos a una atmósfera.

Los hongos fueron mantenidos en placas con medio MNM en una cámara de crecimiento a 25°C.

### 3.3- TRANSPLANTE Y DISEÑO DE INOCULACIÓN

Las plantas enraizadas fueron transplantadas a macetas y puestas en primera instancia en cámaras de crecimiento (25°C y 16hs de luz) para su aclimatación y posteriormente en invernáculo durante tres meses. En todos los casos las plantas fueron regadas diariamente, pero en ningún caso fueron tratadas con fertilizantes, herbicidas o insecticidas.

Se realizaron dos ensayos. En el primero se utilizó el sustrato comercial AGROPLUS; el cual fue esterilizado en autoclave durante una hora a 120°C.

Se realizaron seis tratamientos con 20 repeticiones. Los tratamientos fueron:

- 1- plantas inoculadas con VAM.
- 2- plantas inoculadas con  $C_2$ .
- 3- plantas inoculadas con  $Pt_{23}$ .
- 4- plantas inoculadas con VAM- $C_2$ .
- 5- plantas inoculadas con VAM- $Pt_{23}$ .
- 6- plantas testigos, sin inocular.

En el segundo ensayo el sustrato usado fue el mismo sustrato comercial AGROPLUS diluido a la mitad con arena dulce, el cual también fue autoclavado.

Se realizaron cuatro tratamientos independientes y fueron 15 repeticiones por tratamiento.

En esta instancia los tratamientos fueron:

- 1- plantas inoculadas con VAM.
- 2- plantas inoculadas con  $C_2$ .
- 3- plantas inoculadas con  $Pt_{23}$ .
- 4- plantas testigos, sin inocular.

La inoculación de las plantas se realizó al momento del trasplante de los tubos de ensayo a macetas.

La fuente de inóculo para cada caso fue la siguiente: 5 gr de sustrato conteniendo esporas de VAM y 1 ml de licuado de micelio de los hongos  $C_2$  y  $Pt_{23}$ , realizado en forma aséptica en la cámara de flujo. En todos los casos, el inóculo fue colocado en el sustrato, debajo de las raíces de las plantas y en contacto con ellas.

Para los tratamientos con  $Pt_{23}$  se inocularon además con discos de agar con micelio al momento del pasaje de las plantas a macetas de mayor tamaño.

### 3.4- EVALUACIÓN

Se realizaron dos evaluaciones. La primera, al mes de la inoculación y la segunda a los cuatro meses y medio. Las mismas consistieron en determinar el grado de micorrización ecto y endo mediante el conteo de segmentos radiculares y cálculo de peso seco.

Para poder evaluar el grado de micorrización se eligieron al azar 5 plantas / tratamiento, en la primera evaluación. En la segunda evaluación se analizaron todas las plantas que quedaban.

En el laboratorio se procedió al lavado de las raíces en agua corriente con el fin de eliminar todo residuo de sustrato. Acto seguido, se cortó en segmentos de 1 cm aproximadamente.

Los tratamientos con VAM y aquellos con VAM y hongos ectomicorríticos en conjunto, debieron ser teñidos para poder visualizar las estructuras fúngicas.

El procedimiento de decoloración y tinción de las raíces se realizó según la técnica de Koske y Gemma (1989), la cual se describe a continuación:

- 1- Se colocaron las raíces en solución de KOH (5%) durante 24 horas, en frío.
- 2- se retiraron las raíces y se lavaron en agua.
- 3- Se colocaron las raíces en solución alcalina durante 30 minutos, consistiendo la misma en 3 ml de hidróxido de amonio (20%) por cada 30 ml de peróxido de hidrógeno (3%). La solución debe hacerse a la hora de ser usada.
- 4- Se retiraron las raíces de la solución alcalina y se lavaron en agua.
- 5- Se colocaron las raíces en solución de ácido clorhídrico (1%) durante una hora.
- 6- Se retiraron las raíces de la solución ácida e inmediatamente se las colocó en solución colorante durante 30 minutos a 90°C. La composición de la solución colorante es: 500 ml de glicerol y 450 ml de agua por cada 50 ml de ácido clorhídrico (1%); con 0,05% de Azul Tripán.
- 7- Se retiraron las raíces de la solución colorante y se las colocó en solución decolorante-conservante, compuesta de 500 ml de glicerol y 400 ml de agua por cada 50 ml de ácido clorhídrico (1%).

Aquellas raíces provenientes de los tratamientos con hongos ectomicorríticos se colocaron en cajas de Petri con agua y se guardaron en la heladera para su evaluación posterior.

### **3.5- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MICORRIZACIÓN**

Para la determinación del grado de micorrización se utilizó el método de conteo de Giovanetti y Mosse (1980).

Este método permite estimar el grado de micorrización tomando como indicadores los porcentajes de raíces ecto, endo y no micorrizadas basándose en una muestra de 400 trozos de raíces de 1 cm de largo o la totalidad de la misma.

Los trozos se colocaron en una placa de Petri cuyo fondo está dividido por una malla de 1 cm de distancia entre líneas. Luego de dispersados los trozos se procedió al

conteo y se calcularon los porcentajes. Para dicha operación se usó una lupa estereoscópica NIKON modelo SMZ-2T con un rango de aumento de 10x a 63x. Se tomaron además fotos en una cámara fotográfica NIKON MICROFLEX HFX-DX con película de 35 mm y 100 ASA, acoplada a un microscopio OLYMPUS modelo ECE-BI. También se tomaron fotos en la lupa, acoplando la misma cámara fotográfica.

### **3.6- EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS**

Se midió periódicamente el largo de la parte aérea (desde el cuello hasta el punto de inserción del último par de hojas), en maceta y al momento de la evaluación.

Así mismo, se midió el peso seco de la parte aérea, obtenido luego de dejar las muestras en estufa a 70°C durante 48 horas. Los pesos se midieron en una balanza SARTORIUS-WERKE AG tipo 2432, con una precisión de 100 mg y peso máximo de 200 gr

### **3.7- ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LOS SUSTRATOS**

Con el objetivo de conocer las características físico químicas del sustrato se enviaron dos muestras (sustrato completo y sustrato diluido) al laboratorio de análisis de suelos de la Dirección de Suelos y Aguas (MGAP).

## 4. RESULTADOS

### 4.1- MATERIAL VEGETAL

Se observó una buena respuesta del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* (Hill) ex Maiden durante todo el proceso de micropropagación.

No hubo formación de callo, ni se produjo vitrificación en forma importante y el porcentaje de tubos contaminados fue muy bajo, lo que permitió una alta supervivencia de los explantos.

El proceso de enraizamiento fue exitoso, con un porcentaje de 82% de plantas enraizadas.

Las plántulas enraizadas se dividieron en dos grupos diferentes. En el primer grupo, las plántulas utilizadas en el ensayo de sustrato completo (ensayo principal) medían 2 cm de altura en promedio y su aspecto era vigoroso (buen desarrollo radicular, abundantes hojas y coloración verde intensa). Ver foto n° 1.

Las plántulas utilizadas en el segundo grupo, correspondiente al ensayo de sustrato diluido (mitad sustrato y mitad arena), presentaban gran cantidad de callo en las hojas, las raíces no eran vigorosas y la altura promedio era inferior a 2 cm. A pesar de estas características, presentaban gran homogeneidad.

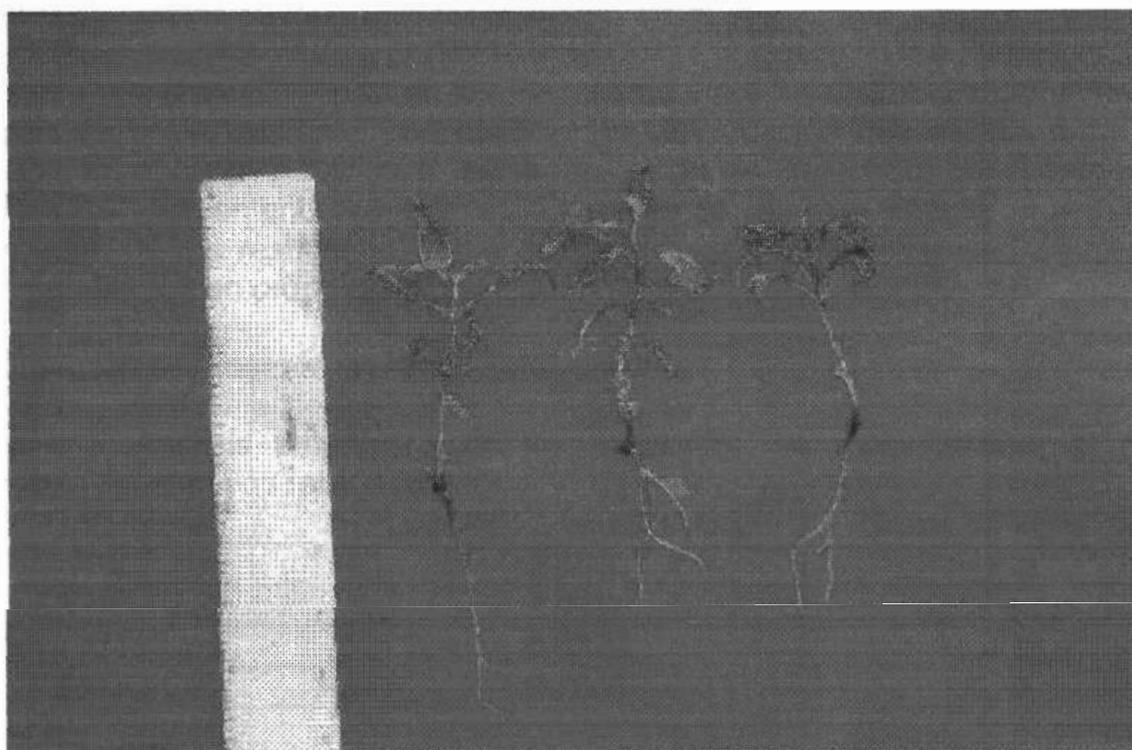


Foto 1. Explantos del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* al momento del trasplante.

## 4.2-DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN

No se obtuvo infección por hongos endomicorríticos, en ninguno de los tratamientos de los dos ensayos, mientras que la infección ectomicorrítica (Pt<sub>23</sub> y C<sub>2</sub>) fue notoriamente baja (con valores entre 3% a 9%).

### 4.2.1-Primera evaluación del ensayo I

En el siguiente cuadro se presentan los resultados promedios de los porcentajes de micorrización en la primera evaluación, al mes del trasplante, del ensayo con sustrato completo (ensayo I):

Cuadro n°1: Porcentajes promedios de micorrización al mes de trasplante (ensayo I):

Tratamiento	C2	ENDO-PT23	PT23	ENDO-C2
Media	14.26	6.20	2.30	2.91
Desvío	2.95	5.07	1.46	1.88
Coef.var. (%)	20.70	81.77	63.65	64.42

Los datos completos se muestran en el anexo.

Se observa una clara diferencia en las respuestas entre los distintos tratamientos, pese a la gran variación existente, con coeficientes de variación que oscilan entre 20% y 80%. En el análisis estadístico se trabajó con el logaritmo del porcentaje de micorrización, por entenderse que este cambio de variable ofrecía una más clara visualización de los resultados. Cabe destacar que el coeficiente de variación de la nueva variable fue en promedio 52%.

La información se presenta en el siguiente cuadro.

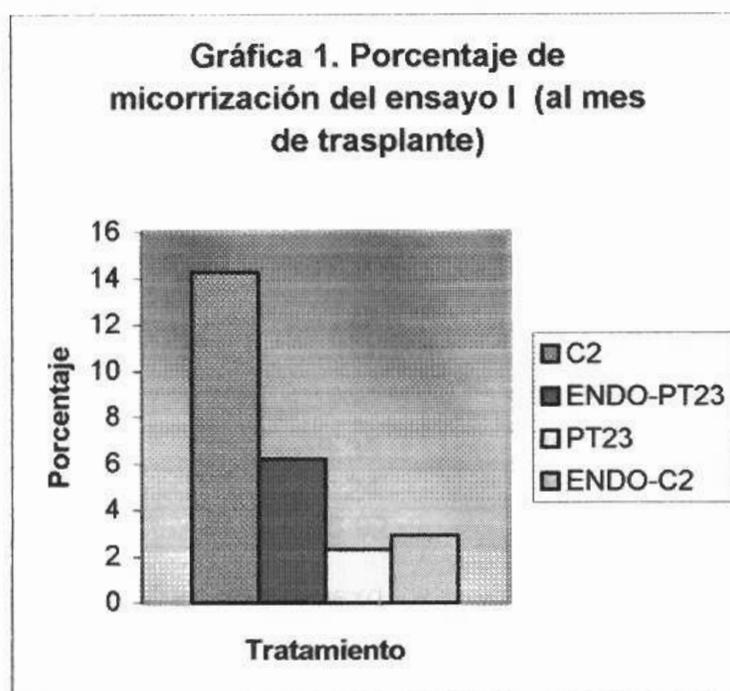
Cuadro n°2: Análisis estadístico de los resultados de micorrización, al mes de trasplante, del ensayo I (alfa 0.05):

Tratamiento	Log. Porcentaje de micor.	Grupo de significación
C2	2.6991	a
ENDO-PT23	1.6493	a b
PT23	0.8326	b
ENDO-C2	0.7606	b

El análisis completo se presenta en el anexo.

La mayor infección se obtuvo en el tratamiento con C<sub>2</sub> (14%), mientras que en el tratamiento combinado Endo-C<sub>2</sub> tan solo se obtuvo 2.9% de micorrización. Los tratamientos Pt<sub>23</sub> y C<sub>2</sub> presentan diferencias significativas.

En la gráfica 1 se muestran los porcentajes de micorrización al mes del trasplante.



En esta instancia no hubo evaluación de los tratamientos con el sustrato diluido con arena dulce (ensayo II).

#### **4.2.2-Segunda evaluación del ensayo I**

Los resultados de la segunda evaluación, a los cuatro meses y medio del trasplante, del ensayo I se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro n°3: Porcentajes promedios de la segunda evaluación, a cuatro meses y medio del trasplante (ensayo I):

Tratamiento	C2	ENDO-PT23	PT23	ENDO-C2
Media	9.32	6.30	4.83	7.24
Desvío	3.30	1.94	1.03	1.30
Coef.var. (%)	35.42	30.72	21.27	17.99

A partir del cuadro anterior y comparándolo con la primera evaluación se observa una notoria disminución de la variación dentro y entre los tratamientos, con valores cercanos al 30%.

También puede notarse la disminución en el porcentaje de micorrización del tratamiento C<sub>2</sub> con respecto a la primera evaluación (9% frente a 14%). Los tratamientos Pt<sub>23</sub> y Endo-C<sub>2</sub> aumentaron al doble sus resultados, mientras que el tratamiento Endo-Pt<sub>23</sub> fue el único en mantener los valores de micorrización.

Los datos completos se muestran en el anexo.

### 4.2.3-Evaluación del ensayo II

La información de la evaluación del ensayo II se resume a continuación:

Cuadro n°4: Porcentajes promedios de micorrización, a cuatro meses y medio del trasplante (ensayo II):

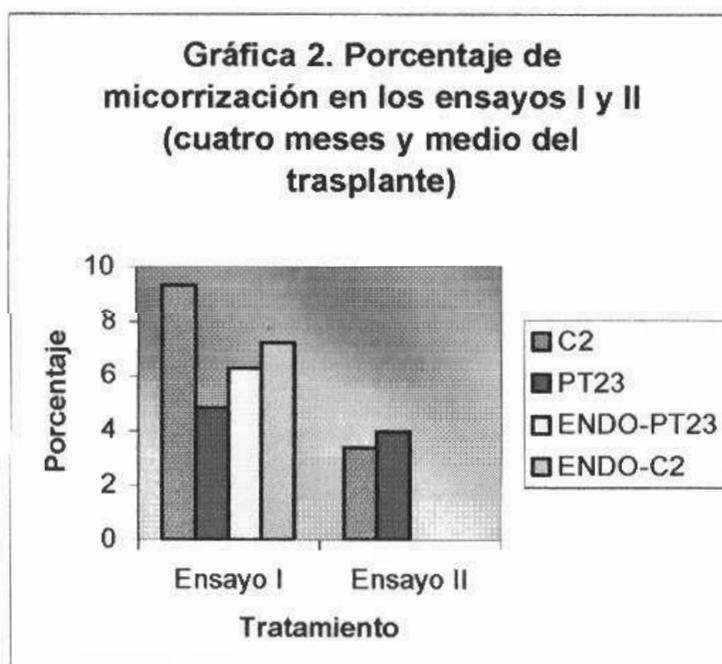
Tratamiento	C2	PT23
Media	3.35	3.97
Desvío	1.24	2.34
Coef.var. (%)	36.92	58.92

Los datos completos se muestran en el anexo.

Se mantienen los porcentajes de micorrización bajos, al igual que una importante variación en los tratamientos.

### 4.2.4-Análisis estadístico

En la gráfica 2 se presentan los porcentajes de micorrización de los dos ensayos.



En el siguiente cuadro se presentan los resultados del análisis estadístico de los porcentajes de micorrización en la segunda evaluación del ensayo I y de la evaluación del ensayo II.

Cuadro nº5: Análisis estadístico del porcentaje de micorrización (alfa 0.05):

	Tratamiento	Log % de micorrización	Grupo de significación
Ensayo I	C2	2.2365	a
	ENDO-C2	2.0321	a b
	ENDO-PT23	1.8801	b c
	PT23	1.6558	c
Ensayo II	PT23	1.3658	d
	C2	1.3051	d

En la evaluación del ensayo I, el tratamiento C<sub>2</sub> se mantiene con el porcentaje más alto, a pesar de éste haber disminuido. Al compararlo con el tratamiento Endo-C<sub>2</sub> se observa que no presenta diferencia significativa (como la presentaba al momento de la evaluación anterior), tal vez como consecuencia del aumento al doble de la infección de este último. Así mismo Endo-C<sub>2</sub> continúa sin presentar diferencia significativa con respecto a Endo-Pt<sub>23</sub> pero este último sí se diferencia del tratamiento C<sub>2</sub>.

El tratamiento Pt<sub>23</sub> presenta diferencia con respecto al tratamiento Endo-C<sub>2</sub>, dado que el aumento del porcentaje de micorrización fue del doble y casi el triple, respectivamente.

En el anexo se presenta la información estadística completa, donde se puede visualizar detalladamente los distintos niveles de significación.

Es clara la diferencia entre los tratamientos del primer ensayo con los del segundo. Dentro de este último no existen diferencias significativas.

De todas formas, el coeficiente de variación es bastante menor que en la primera evaluación, 17%.

En las siguientes fotos bajo la lupa se observan las ectomicorrizas encontradas en la evaluación.

Foto 2. Raíz del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* colonizada por el hongo ectomicorrítico *Pisolithus tinctorius*. (1.2 x)

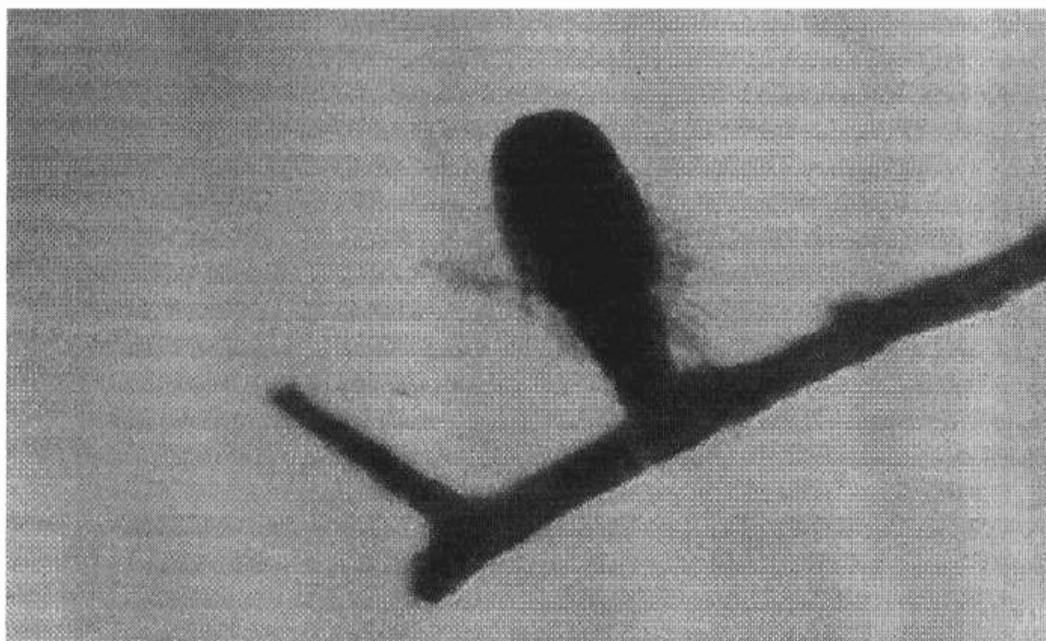


Foto 3. Raíz del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* colonizada por el hongo ectomicorrítico *Pisolithus tinctorius*. Con mayor aumento (3 x)



Foto 4. Raíz del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* colonizada por el hongo ectomicorrítico *Cenococcum graniforme*. (1.5 x)



Foto 5. Raíz del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* colonizada por el hongo ectomicorrítico *Cenococcum graniforme*. (1.4 x)

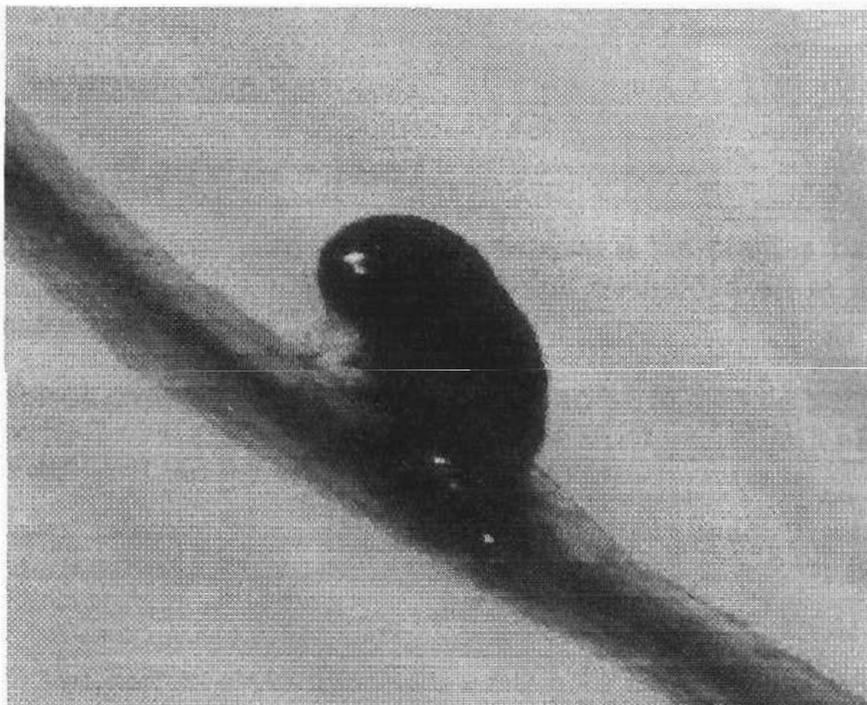
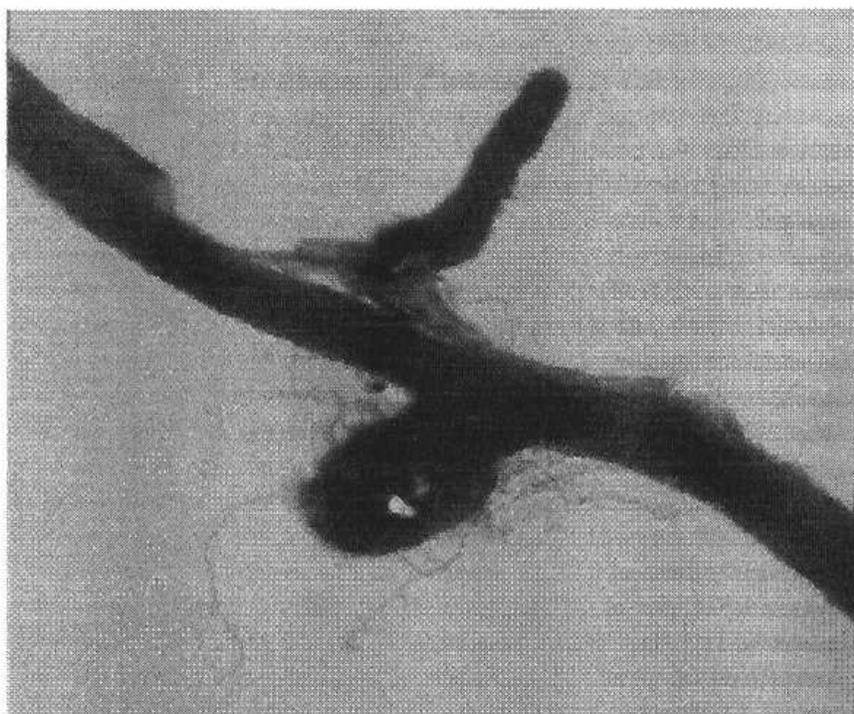


Foto 6. Raíz del clon BS<sub>8</sub> de *Eucalyptus grandis* colonizada por el hongo ectomicorrítico *Pisolithus tinctorius*. (1.5 x)



## 4.3-EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS

### 4.3.1-Peso de las plantas

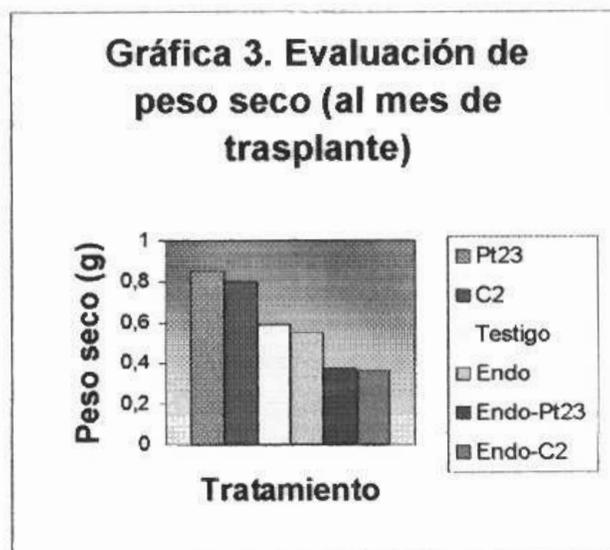
#### 4.3.1.1- Primera evaluación del ensayo I

Los siguientes resultados corresponden solamente a las plantas del primer ensayo, debido a que el peso fue medido en las plantas evaluadas en la determinación del porcentaje de micorrización, al mes de trasplante.

Cuadro nº6: Pesos promedios en la primera evaluación, al mes de trasplante (ensayo I):

Tratamiento	PT23	C2	TESTIGO	ENDO	ENDO-PT23	ENDO-C2
Media	0.85	0.80	0.59	0.55	0.38	0.37
Desvío	0.45	0.43	0.14	0.32	0.13	0.07
Coef.var. (%)	52.46	54.34	24.32	58.17	33.62	19.41

En la gráfica 3 se presentan los pesos promedio del ensayo I en la primera evaluación, al mes de trasplante.



En el siguiente cuadro se presenta el análisis estadístico de los pesos de las plantas en la primera evaluación.

Cuadro nº7: Análisis estadístico de los pesos en la primera evaluación del ensayo I, al mes de trasplante (alfa 0.05):

Tratamiento	Peso de las plantas	Grupo de significación
PT23	0.85	a
C2	0.80	a
TESTIGO	0.59	a b
ENDO	0.55	a b
ENDO-PT23	0.38	b
ENDO-C2	0.37	b

No existen diferencias significativas entre los tratamientos  $Pt_{23}$  y  $C_2$ , sin embargo sí existen, como se vio, en los grados de infección.

Tampoco existen diferencias entre los tratamientos Endo- $Pt_{23}$  y Endo- $C_2$  como en los porcentajes de micorrización.

Las claras diferencias se observan entre los tratamientos  $Pt_{23}$  y  $C_2$ , con los tratamientos Endo- $Pt_{23}$  y Endo- $C_2$  donde los valores alcanzados por los primeros duplican a los segundos. Cabe destacar que el tratamiento  $C_2$  con el mayor porcentaje de micorrización (14%), no se corresponde con el mayor peso. Además, el tratamiento  $Pt_{23}$  tiene tan solo 2.3% de infección y no presenta diferencia significativa en peso con el tratamiento  $C_2$ .

#### 4.3.1.2- Segunda evaluación del ensayo I

En esta última evaluación, a los cuatro meses y medio del trasplante, se analizaron las plantas restantes de todos los tratamientos del primer ensayo. En el cuadro nº8 se presentan los resultados de la evaluación.

Cuadro nº8: Pesos promedios a los cuatro meses y medio del trasplante (ensayo I):

Tratamiento	ENDO-PT23	C2	TESTIGO	ENDO-C2	PT23	ENDO
Media	8.24	7.25	6.51	6.22	6.11	5.77
Desvío	0.80	1.94	0.86	2.24	1.17	1.86
Coef.var. (%)	9.79	26.8	13.22	36.10	19.17	32.31

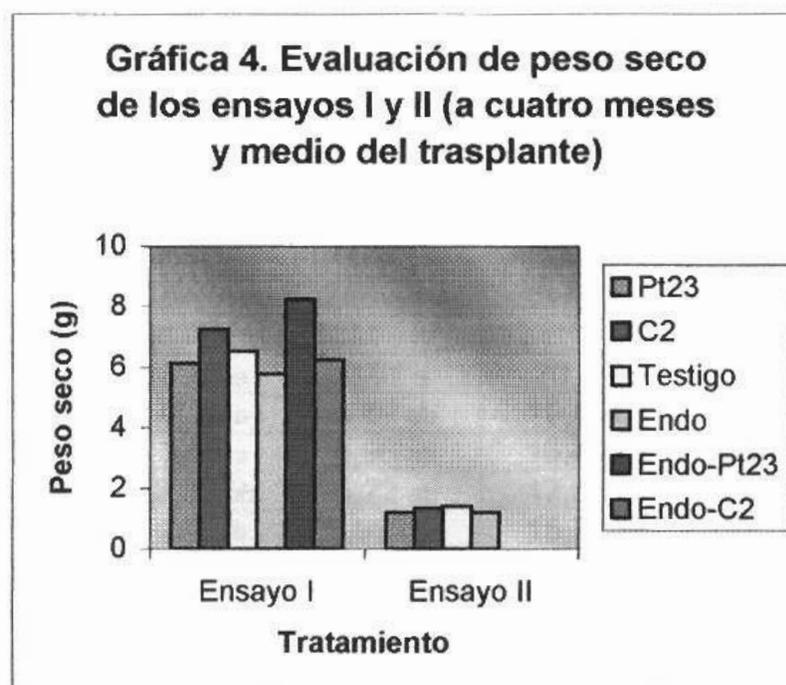
#### 4.3.1.3-Evaluación del ensayo II

Cuadro Nº9: Pesos promedios a los cuatro meses y medio del trasplante (ensayo II):

Tratamiento	TESTIGO	C2	ENDO	PT23
Media	1.41	1.34	1.21	1.20
Desvío	0.05	0.25	0.31	0.28
Coef.var. (%)	3.7	19.00	25.56	23.3

#### 4.3.1.4-Análisis estadístico

En la gráfica 4 se presentan los pesos secos de los ensayos I y II a los cuatro meses y medio del trasplante.



Cuadro n°10: Análisis estadístico de los pesos a los cuatro meses y medio del trasplante (ambos ensayos) (alfa 0.05):

	Tratamiento	Peso de las plantas	Grupo de significación
Ensayo I	ENDO-PT23	8.24	a
	C2	7.25	a b
	TESTIGO	6.51	b c
	ENDO-C2	6.22	b c
	PT23	6.11	b c
	ENDO	5.77	c
Ensayo II	TESTIGO	1.41	d
	C2	1.34	d
	ENDO	1.21	d
	PT23	1.20	d

Como se puede apreciar en los cuadros n°8 y n°9, los dos ensayos presentan bajos coeficientes de variación, siendo el promedio de 26.5%. A su vez, el análisis estadístico demuestra (al igual que en la variable porcentaje de micorrización) una diferencia marcada entre los dos ensayos y una uniformidad dentro de cada uno (más notorio en el ensayo II).

Los resultados completos se pueden apreciar en el anexo.

### **4.3.2-Alturas de las plantas**

En el siguiente cuadro se resume la evolución de las alturas de las partes aéreas de las plantas de ambos ensayos.

Cuadro N°11: Evolución de alturas de parte aérea en ambos ensayos:

	Tratamiento	Altura (cm)				
		1er mes	2do mes	3er mes	4to mes	4to mes y medio
Ensayo I	ENDO-PT23	3,83 a	6,81 a	20,34 a	37,06 a	46,85 ab
	C2	3,78 a	5,67 ab	19,15 ab	37,31 a	47,8 a
	ENDO-C2	3,68 a	4,96 ab	16,43 ab	34,91 a	45,2 abc
	TESTIGO	3,32 ab	5,22 ab	17,68 ab	35,63 a	43,13 bc
	PT23	3,2 ab	3,99 bcd	15,71 bc	37,53 a	46,57 abc
	ENDO	2,84 bc	4,46 bc	15,07 bcd	32,85 a	42,74 c
Ensayo II	ENDO	2,42 cd	2,86 cd	11,29 de	23,67 b	27,67 d
	C2	2,19 cd	2,84 cd	11,82 cd	24,4 b	29,01 d
	TESTIGO	1,99 d	2,07 d	7,6 e	22,07 b	26 d
	PT23	1,78 d	2,58 cd	11,65 cde	21,78 b	26,47 d

A partir del cuadro anterior se puede observar una tendencia a lo largo de las evaluaciones, en la cual no existen grandes variantes entre los tratamientos. En línea general, aquellos tratamientos con mayores alturas (C<sub>2</sub> y Endo-Pt<sub>23</sub>) las mantienen frente a los restantes tratamientos. Al cuarto mes de evaluación se produce una homogeneización de las alturas, pero en la siguiente evaluación comienzan nuevamente a producirse diferencias entre tratamientos, sin llegar a ser muy marcadas.



En las siguientes fotos se pueden observar las diferencias de alturas entre tratamientos. Las mismas fueron tomadas al mes y a los cuatro meses y medio del trasplante.

Foto 7. Altura de las plantas micropropagadas de *Eucalyptus grandis* al mes del trasplante.

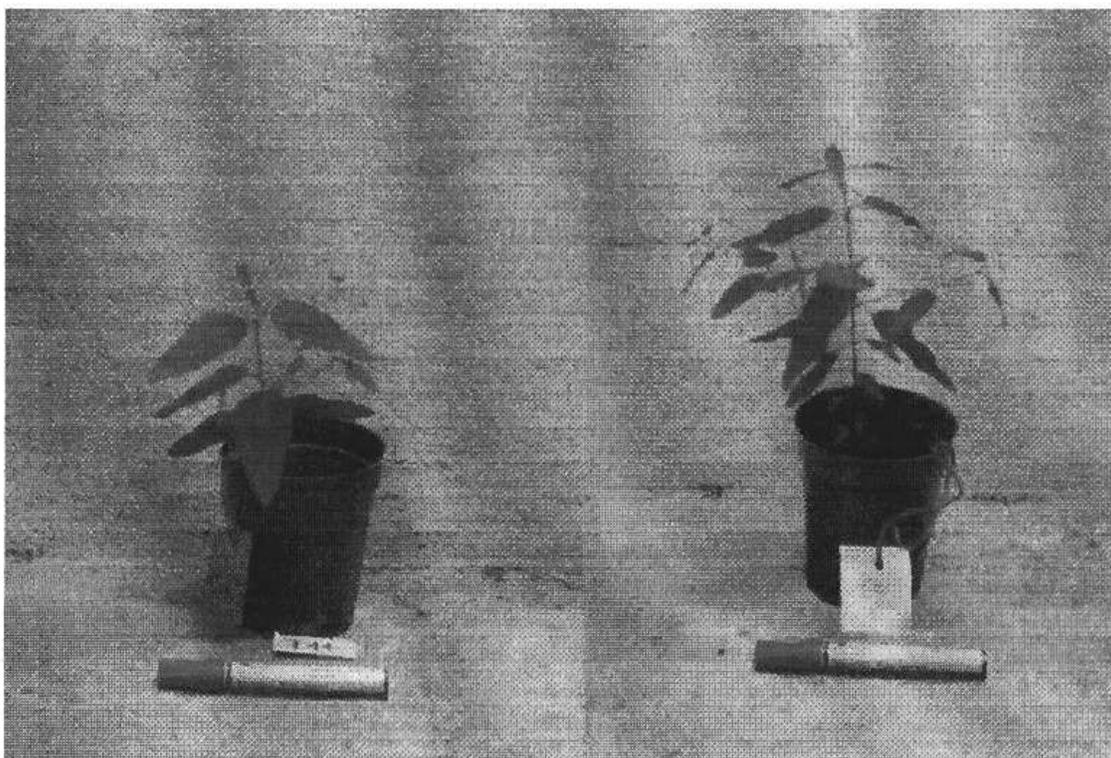
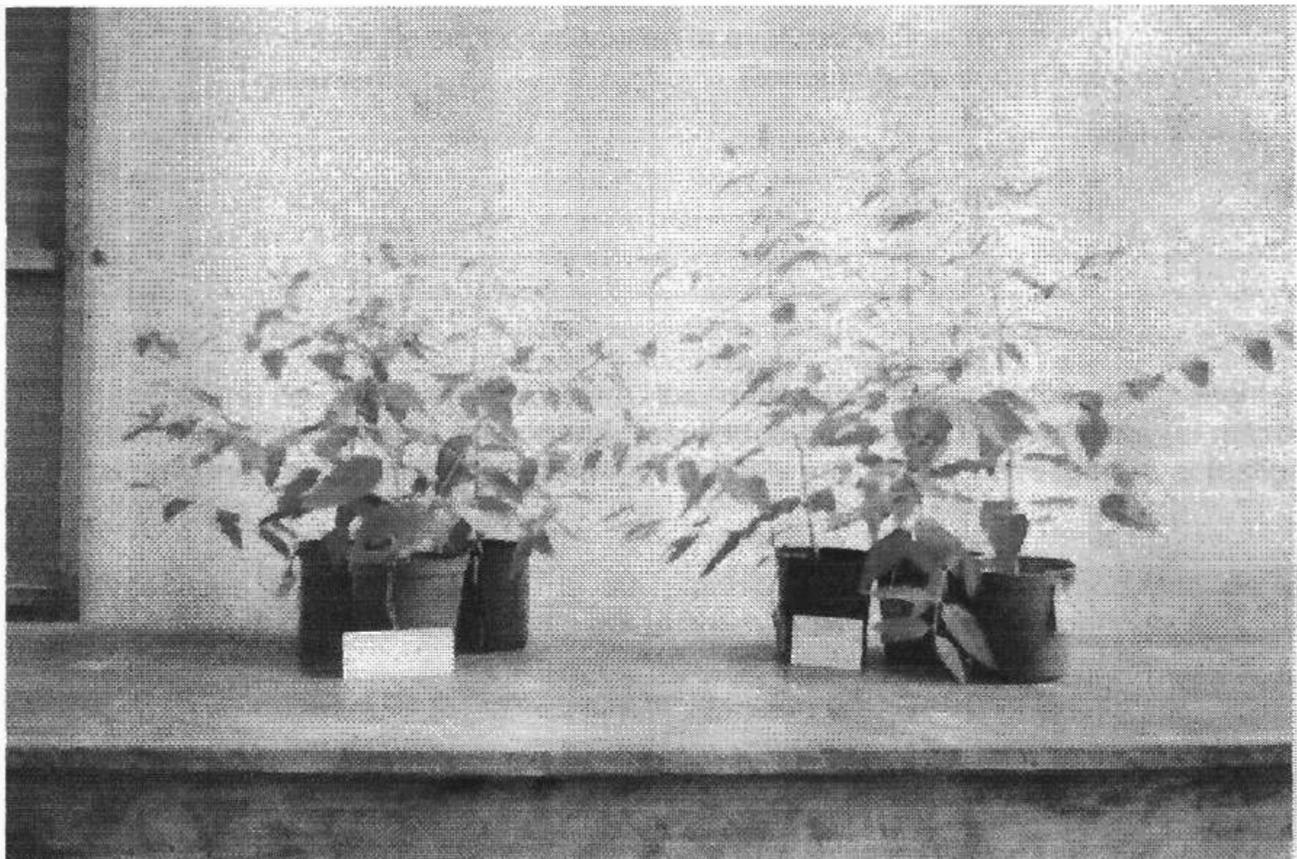


Foto 8. Altura de las plantas micropropagadas de *Eucalyptus grandis* a los cuatro meses y medio del trasplante.



### **4.3.3-Supervivencia de plantas**

Los porcentajes de supervivencia de las plantas del ensayo I al momento de la evaluación final (cuatro meses y medio del trasplante) se presentan a continuación. El cálculo se basa a partir de las plantas supervivientes luego de la primera evaluación.

Cuadro N°12: Porcentaje de supervivencia en la evaluación final (ensayo I):

Tratamiento	Porcentaje de supervivencia (%)
C2	85
PT23	85
ENDO-C2	80
ENDO-PT23	70
ENDO	80
TESTIGO	95

Los porcentajes de supervivencia entre los diferentes tratamientos no presentan marcadas diferencias, siendo en general, resultados bastante homogéneos (el menor valor corresponde al tratamiento Endo-Pt<sub>23</sub> con 70% y el mayor corresponde al testigo con 95%).

Los porcentajes de supervivencia de las plantas del ensayo II al momento de la evaluación final (cuatro meses y medio del trasplante) se presentan a continuación:

Cuadro N°13: Porcentaje de supervivencia en la evaluación final (ensayo II):

Tratamiento	Porcentaje de supervivencia (%)
C2	73
PT23	40
ENDO	60
TESTIGO	20

Es notorio el amplio rango de resultados en el porcentaje de supervivencia entre los tratamientos, donde la menor supervivencia corresponde al testigo (20%) y la mayor corresponde al tratamiento C<sub>2</sub> (73%).

#### **4.4-Análisis químico del sustrato**

El análisis químico del sustrato del primer ensayo (sustrato completo), realizado por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección Suelos y Aguas, se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro N°14: Análisis químico del sustrato del primer ensayo:

PH H <sub>2</sub> O	5.0
PH HCl	4.1
% Materia orgánica	1.9
P (ppm)	32
K (meq/100g de suelo)	0.62
Ca (meq/100g de suelo)	8.4
Mg (meq/100g de suelo)	2.8
Na (meq/100g de suelo)	0.38

El análisis químico del sustrato del segundo ensayo (mitad sustrato, mitad arena dulce), se presenta a continuación:

Cuadro N°15: Análisis químico del sustrato del segundo ensayo:

PH H <sub>2</sub> O	5.1
PH HCl	4.4
% Materia orgánica	0.7
P (ppm)	29
K (meq/100g de suelo)	0.24
Ca (meq/100g de suelo)	3.9
Mg (meq/100g de suelo)	1.2
Na (meq/100g de suelo)	0.49

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1-PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN

En la primera evaluación del ensayo I se constató un porcentaje muy bajo de micorrización con valores entre 2.3% y 14% de ectomicorrizas, no obteniéndose infección por parte de los hongos endomicorríticos. En la segunda evaluación, si bien hubo un incremento de los porcentajes, en forma general se mantuvieron bajos. Uno de los factores que podría incidir en estos resultados fue la temprana evaluación de los ensayos. Quintos (1987), en un estudio de inoculación con *Pisolithus tinctorius* en plántulas de *Pinus engelmannii*, en condiciones de vivero, comenzó sus evaluaciones a los 6 meses de inoculación y finalizó las mismas al cabo de 12 meses. Martins (1996) inoculó in vitro y al momento del trasplante, plantas micropropagadas de *Castanea sativa* con cuatro hongos ectomicorríticos y realizó las evaluaciones a las 18, 25 y 30 semanas. En el presente trabajo las evaluaciones comenzaron al mes del trasplante y finalizaron a los cuatro meses y medio del mismo.

La ausencia de micorrizas vesículo-arbusculares (VAM) pudo deberse a varios factores. Se cita que la eficacia de las VAM depende del nivel de P en el sustrato y que no son de esperar efectos positivos a niveles altos de P asimilable (Arines, ¿??). En estudios de invernáculo se encontró que, según la especie de VAM, variaba el nivel de P que reducía la formación de la micorriza (Abbott, 1991).

En el presente trabajo, el sustrato utilizado poseía 32ppm de fósforo.

Cordell (1987) encontró que los beneficios de la inoculación VAM a plantas de *Juglans nigra* en condiciones de vivero, ocurren cuando el nivel de P es menor a 75ppm. A niveles más altos, las plantas no micorrizadas crecen igual que las micorrizadas. Sin embargo, a campo, con un nivel menor de P (10-15ppm) las plantas micorrizadas sobreviven más luego del trasplante que las plantas no micorrizadas o con pobre nivel.

Irisity e Irureta (1996) encontraron infecciones de VAM en plantas de *Eucalyptus grandis*, en condiciones de vivero, al momento del trasplante a campo, del orden de 15% cuando el nivel de P del sustrato era menor a 150ppm. Cuando este nivel era excedido (265, 312, 360ppm) los porcentajes disminuían a 8.9, 8.7 y 6.5% respectivamente. Los porcentajes de micorrización ectomicorrítica se mantenían en todos los casos en el orden de 29%.

Sin embargo, Kozloviz et al. (1997), no encontraron infecciones de VAM en plantas de *Eucalyptus grandis* con edades de 14 y 18 semanas y los porcentajes de ectomicorrizas fueron bajos (14%) en sustratos con un contenido de P de 52ppm. Las condiciones también eran de vivero.

Otro factor a tener en cuenta en el éxito de la infección de VA es el tipo de inóculo utilizado. A pesar de que las VAM son infectivas enseguida de la penetración, la vida

de los arbusculos es pequeña y se ha observado su senescencia 4 días después de la formación (Toth y Miller, 1984, citado por Read, 1991).

El suelo es considerado como un inóculo más rápidamente infectivo que las esporas, posiblemente por el mayor número de propágulos infectivos (hifas, fragmentos de raíces micorrizadas y esporas).

En el caso del uso de las esporas como inóculo es necesario una mínima densidad de esporas para asegurar una rápida colonización. Se recomienda una densidad aproximada de 300 a 500 esporas por 500g de suelo y aproximadamente 10 000 esporas/m<sup>2</sup> del área de plantación para asegurar una rápida colonización (Ferguson et al. 1982).

Generalmente cualquier especie de VAM puede asociarse con cualquier especie de planta. Existe evidencia de no-especificidad en las asociaciones VAM (Mc Gonigle y Fitter, 1990), en condiciones de invernáculo y con inóculos mono-específicos. Sin embargo no hay que descartar la posibilidad de que en una mezcla de hongos, la planta huésped sea infectada preferencialmente por uno de ellos. Se denomina especificidad ecológica, atribuida también a las ectomicorrizas.

Con respecto al comportamiento de los hongos ectomicorríticos, también pueden señalarse una serie de factores condicionantes.

Soares et al. (1990) encontraron que el desarrollo de las ectomicorrizas en *Eucalyptus grandis* por *Pisolithus tinctorius* fue totalmente inhibido cuando las concentraciones de P excedían 13 ppm.

Mullette (1976) encontró que la micorrización por *Pisolithus tinctorius* se vio influida por la concentración de P. No hubo desarrollo en concentraciones mayores a 10ppm. Sin embargo la ausencia total de P tampoco beneficia la micorrización: resultados de experimentos en arena inoculada con el hongo demuestran que la infección en *Eucalyptus gummifera* fue menor cuando el nivel de P era 0ppm frente a 5ppm (52% vs 72%).

Bougher et al (1989) encontraron que a bajos niveles de P (2 ppm) aumentaba la frecuencia de plantas de *Eucalyptus diversicolor* micorrizadas en vivero. No se obtuvo actividad fúngica en los niveles superiores a 36ppm.

En el mismo trabajo se pudo observar, que en el rango de respuesta a la micorrización (2 a 12 ppm), distintos aislamientos de hongos ectomicorríticos diferían en su habilidad para promover el crecimiento de las plantas. Todos ellos, excepto *Pisolithus tinctorius*, provocaron una respuesta en el crecimiento de las plantas.

En cambio, en plantas de semilla y micropropagadas de *Castanea sativa* solo *Pisolithus tinctorius* logró formar micorrizas completas, en tanto *Amanita muscaria* y *Laccaria laccata* estimularon las raíces, induciendo cambios en la morfología radicular, crecimiento de la planta y supervivencia sin la formación de extensas micorrizas y sin un desarrollo de la red de Hartig (Martins, 1996). Puede referirse a una especificidad ecológica, ya mencionada en párrafos anteriores.

A pesar de lo encontrado por Bougher, muchas investigaciones se han centrado en el estudio y uso de *Pisolithus tinctorius* por su gran adaptabilidad a condiciones

ambientales extremas, amplitud geográfica de ocurrencia y beneficios demostrados a los árboles, tanto en vivero como en plantación (Cordell, 1987; Le Tacon et al. 1985).

El inóculo de hongos ectomicorríticos más ampliamente usado es humus o suelo de plantaciones ya establecidas (Marx y Kenney, 1982). El inóculo compuesto de esporas en un sustrato húmedo (vermiculita, caolinita o arena) presenta una serie de ventajas y desventajas. La principal ventaja es que las esporas no requieren una etapa prolongada en un medio aséptico. Además, las esporas son livianas (1g de esporocarpio de *Pisolithus tinctorius* contiene un billón de propágulos infectivos potenciales). Sin embargo una desventaja es que, una vez contabilizado el inóculo, el mismo no está estandarizado por tests de laboratorio para determinar su viabilidad (Marx y Kenney, 1982).

El inóculo puro vegetativo puro ha sido ampliamente recomendado, pero no siempre es posible aislar las especies de hongos deseadas. En el caso de *Pisolithus tinctorius* se ha trabajado con éxito (Le Tacon et al. 1985; Cordell et al. 1987). Si bien *Cenococcum graniforme* presenta un crecimiento más lento en cultivos puros (Megumi, 1988), también tolera con éxito el manipuleo de laboratorio. Megumi considera además, que el cultivo axénico puede afectar su capacidad de formar micorrizas.

Otro factor a tener en cuenta, es el hecho de que *Cenococcum graniforme* no forma carpóforos, lo que dificulta su fácil visualización a campo con el fin de realizar una colecta para una producción masiva de inóculo vegetativo. Sin embargo, este hongo presenta una alta capacidad infectiva cuando no tiene competencia, lo que resulta muy conveniente para viveros (Malvárez, com.pers.).

Chilvers et al. (1987) encontraron que en una inoculación conjunta con hongos VA y ectomicorríticos, si la infección es inicialmente de estos últimos, el tejido vegetal ocluye los sitios de infección de las VAM, impidiendo la infección posterior.

Analizando los resultados de los tratamientos de las plantas micropropagadas de *Eucalyptus grandis* inoculadas al trasplante con C<sub>2</sub> y aquellas con Endo-C<sub>2</sub>, se puede constatar una notoria disminución en el porcentaje de infección del tratamiento combinado (14% vs 2.9%). Es posible pensar en una interacción negativa entre los hongos. Sin embargo, al observar los tratamientos Pt<sub>23</sub> y Endo- Pt<sub>23</sub> la interacción sería positiva ya que los porcentajes de infección obtenidos son 2.3% y 6.2% respectivamente.

Muchos géneros de árboles como *Acacia*, *Casuarina*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Tilia*, *Ulmus* y también helechos y arbustos forman los dos tipos de micorrizas (Marx, 1991). Recientes observaciones acerca del reemplazo temporal de las VAM por hongos ectomicorríticos en raíces de *Alnus* (Beddiar, 1984), *Helianthemum* (Read et al.1987) y *Eucalyptus* (Lapeyrie y Chilvers, 1985; Chilvers et al.1987), sugieren la posibilidad de interacciones negativas entre los hongos.

Chilvers et al. (1987) y Lodge (1985) sugieren que este reemplazo es por prevención por parte de las ectomicorrizas frente a una nueva colonización y expansión de las VAM. También puede deberse a cambios fisiológicos de la planta y producción de carbohidratos con la edad o por cambios en la microflora del suelo.

Los bajos porcentajes de micorrización obtenidos en el ensayo II (4%) pueden deberse a factores propios de las plantas. Las mismas poseían un pobre desarrollo radicular, lo cual pudo influir en una menor infección.

## 5.2-CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS

### 5.2.1-Pesos de las plantas

Al analizar los resultados de los pesos, en la primera evaluación, se constataron diferencias entre los tratamientos con los dos hongos ectomicorríticos.

El tratamiento Pt<sub>23</sub>, con menor porcentaje de micorrización, fue el que presentó el mayor peso, pero no hubo diferencias significativas con el tratamiento C<sub>2</sub>, con un porcentaje de infección 7 veces mayor que el anterior.

Esta diferencia podría estar dada por la eficiencia de los hongos en la captación de nutrientes, o por la traslocación de fotosintatos de la planta hacia el hongo.

Diferencias entre ectomicorrizas en su habilidad para aumentar el crecimiento de las plantas en suelos con deficiencias de P, se correlacionó con su habilidad para colonizar las raíces, pero en otras instancias hubo pobre correlación entre el crecimiento y la colonización (Mullette, 1976).

Estudios han demostrado que se produce un pasaje de carbohidratos desde la planta hacia los hongos micorríticos que puede provocar una depresión en el crecimiento (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991). Las autoras sostienen que esto se debe a que los hongos aún no han concretado una colonización intrarradical (no aportan ningún beneficio a la planta) pero sí consumen fotosintatos para su desarrollo inicial. Estas depresiones se pueden prolongar si la fotosíntesis está limitada, o en el caso en que las plantas crezcan en suelos de alta fertilidad, en las cuales las raíces pueden estar colonizadas por los hongos (con el consiguiente consumo de productos de fotosíntesis) cuando ella, por sí misma, se basta para captar sus nutrientes a un ritmo adecuado.

Existen estudios en los cuales se ha demostrado que la traslocación de fotosintatos puede llegar a alcanzar 10% de la producción total, en presencia de VAM (Smith et al. 1988) y hasta 15% en presencia de hongos ectomicorríticos (Söderström, 1991). Fogel y Hunt (1983) encontraron que la traslocación de fotosintatos hacia los hongos ectomicorríticos en una plantación de *Pseudotsuga* en Oregon era de 24%.

Esto no debería ser tomado como una pérdida de energía para la planta si ésta se encontrara en condiciones de baja fertilidad. Si el suelo no presenta ninguna deficiencia en nutrientes, las micorrizas no serían necesarias para la planta (Kropp, 1990).

En la primera evaluación, el tratamiento con  $C_2$  presentó una leve superioridad en el peso frente al testigo (1.35 veces), si bien esta diferencia no era significativa. Esta ventaja se redujo en la segunda evaluación (1.11 veces) aunque tampoco representó diferencia significativa. El porcentaje de micorrización disminuyó entre las dos evaluaciones.

Con respecto al tratamiento con  $Pt_{23}$  la tendencia fue similar al tratamiento anterior. En ninguna de las dos evaluaciones hubo diferencias significativas, a pesar de que en la evaluación final en el tratamiento con  $Pt_{23}$  se obtuvieron valores inferiores a los testigos. En este caso el porcentaje de micorrización aumentó al doble entre las dos evaluaciones.

Mosse (1973) encontró que al inocular plantas de *Allium sp* con hongos endomicorríticos en un suelo proveniente de una plantación forestal, los pesos de las plantas eran menores que los de los testigos cuando se agregaba 200 y 500ppm de P. Al agregar volúmenes mayores de P, los testigos también se vieron afectados negativamente.

No se han encontrado estudios que citen un efecto de los hongos endomicorríticos en las plantas a pesar de no existir simbiosis. Dadas las características de los resultados obtenidos en este presente trabajo, es posible pensar en un efecto depresivo en el peso con respecto al testigo, aunque no muy marcado.

Cuando se observan los resultados de los tratamientos combinados con hongos ectomicorríticos y VAM, la tendencia no es la misma. Mientras que el porcentaje de micorrización del tratamiento Endo- $Pt_{23}$ , en la primera evaluación, es el doble al del tratamiento Endo- $C_2$  no hay diferencias en sus pesos. Ambos son menores a los presentados por los testigos (0.63 veces).

En la segunda evaluación, el tratamiento Endo- $Pt_{23}$  mantuvo su porcentaje de micorrización y alcanzó pesos superiores a los testigos (1.26 veces), con diferencias significativas. El tratamiento Endo- $C_2$  aumentó al doble su infección pero no se tradujo en un aumento de peso con respecto al testigo, permaneciendo con registros inferiores, aunque con menor diferencia (0.95 veces).

Parece ser, que un bajo porcentaje de micorrización es suficiente para lograr un incremento en el peso de las plantas y que un mayor porcentaje no se traduce en mayores beneficios para la planta.

Las plantas del ensayo II presentaban gran uniformidad entre tratamientos. Por las razones de performance ya mencionadas los valores son sensiblemente inferiores a los del ensayo I.

### **5.2.2-Alturas de las plantas**

No se ha encontrado correlación entre la altura de las plantas y el porcentaje de micorrización.

En un estudio de respuestas de crecimiento de *Lygeum spartum* L a la inoculación con *Glomus fasciculatum* y a la fertilización fosforada, Díaz y Honrubia (1993), encontraron que la micorrización produjo incrementos significativos de biomasa y no tanto en altura con respecto a los testigos para niveles de P de 0, 30 y 60ppm.

Browning y Whitney (1992) encontraron que hay un efecto positivo de *Laccaria bicolor* en la altura de brotes de *Picea mariana*, en condiciones de cámaras de crecimiento. Cuando el nivel de P era 0.4mg de P por semilla, las plantas inoculadas presentaban mayor altura que las testigos pero cuando el nivel era de 1.0mg de P por semilla los resultados se revertían.

Martins et al (1996) encontraron que plantas micropropagadas de *Castanea sativa* inoculadas con *Pisolithus tinctorius* alcanzaron alturas significativamente mayores que los testigos. En su estudio, la altura fue influida por la presencia de los hongos micorríticos, aún en los casos en que no se produjo infección.

### **5.2.3-Supervivencia de las plantas**

Dadas las características muy favorables del sustrato (ver análisis de sustrato cuadro nº13), no hubo diferencias en los porcentajes de supervivencia entre los tratamientos y el testigo del ensayo I. Las plantas pudieron desarrollarse en ausencia de los inóculos.

En el ensayo II se pudo observar diferencias de supervivencia entre tratamientos. Se podría sugerir que la presencia de los hongos (con o sin infección) ayudó a una mayor supervivencia de las plantas (73% C<sub>2</sub>, 60% Endo, 40% Pt<sub>23</sub> vs 20% testigo).

Martins et al. (1996) encontraron que los porcentajes de supervivencia de plantas de *Castanea sativa* inoculadas con cuatro especies de hongos ectomicorríticos (*Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Piloderma croceum*) fueron mayores que los controles. Los mismos fueron 34% para las plantas de semilla y 28% para las plantas micropropagadas frente a 19.4% y 9% de los testigos respectivamente.

En el mismo trabajo, los investigadores observaron que una inoculación al sustrato, tres semanas previas al trasplante, permitía una más rápida asociación de los hongos con la planta y en consecuencia aumentaba el porcentaje de supervivencia (47.5% vs 83% para la inoculación al trasplante y previo al mismo, respectivamente).

Debido a la baja capacidad de las raíces o por la deficiente regulación estomática frente a una pérdida de agua, las plantas micropropagadas son muy susceptibles a un estrés de agua. El período de aclimatación es de vital importancia, ya que las raíces se

adaptan a un nuevo medio en donde existen menores niveles de nutrientes y las condiciones son autotróficas (Bonga, 1977; Flick et al. 1983; citados por Martins, 1996).

En estas condiciones, la presencia de micorrizas aumentaría la disponibilidad de nutrientes como fósforo y nitrógeno facilitando su absorción.

Plántulas de robles y pinos inoculadas con *Pisolithus tinctorius* presentaron diferencias en su supervivencia relacionadas con el grado de micorrización. Aquéllas que presentaban mayores niveles toleraban mejor los déficits de agua o altas temperaturas que los testigos (Marx y Cordell 1989).

Heslin y Douglas (1986) no encontraron incrementos en la supervivencia de plantas micropropagadas de *Populus* así como tampoco lo hicieron otros autores (Rancillac 1983; en *Betula*, Grellier et al. 1984; en *Eucalyptus*, Poissonier 1986; en *Castanea*, Strullu et al. 1986), citados por Martins (1996).

Sin embargo otros autores encontraron beneficios en la supervivencia con la micorrización (Boyd et al. 1986; Meyer 1987; en *Picea*, Feil et al. 1988; Le Tacon et al. 1992), citados por Martins (1996).

## 6. CONCLUSIONES

- El bajo porcentaje de micorrización observado en todos los tratamientos puede haberse debido a la temprana evaluación de los ensayos. Muchos estudios realizan sus primeras evaluaciones a los seis meses de la inoculación mientras que en este trabajo se evaluó al mes.
- Otra causa de estos resultados es el sustrato empleado. El nivel elevado de los nutrientes inhibe el desarrollo abundante de micorrizas.
- Para que la inoculación masiva de plantas en viveros sea redituable, el sustrato debe ser pobre en nutrientes. De otra forma, la inoculación no se hace imprescindible y no se justifican los gastos en materiales e infraestructura.
- Si bien la inoculación con hongos endomicorríticos no fue exitosa, presumiblemente por los niveles de fósforo en el sustrato, el estudio de otras fuentes de inóculo es aconsejable.
- *Pisolithus tinctorius* parece ser más efectivo que *Cenococcum graniforme*. Con menores porcentajes de micorrización, alcanza pesos más elevados. Sin embargo los tratamientos inoculados con los hongos ectomicorríticos presentaron pesos menores que los testigos. El pasaje de carbohidratos desde la planta hacia los hongos podría ser uno de los responsables.
- No se han encontrado estudios sobre el efecto de los hongos endomicorríticos en las plantas a pesar de no existir simbiosis. Podría existir algún efecto sobre las plantas que determine su grado de desarrollo radicular, peso y altura. Tal vez podría afectar la disponibilidad de nutrientes en el suelo.
- No hubo diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia de las plantas en el ensayo I (utilizando el sustrato completo). El sustrato fue lo suficientemente rico en nutrientes como para permitir la supervivencia de las plantas. En cambio en el ensayo II (utilizando mitad sustrato y mitad arena), hubo diferencias entre los tratamientos inoculados y el tratamiento testigo. En este caso, los hongos pudieron favorecer la supervivencia de las plantas.

## 7.RESUMEN

Debido al gran desarrollo presentado por el sector forestal en los últimos años, nuevas líneas de investigación se han implementado.

Programas de mejoramiento genético y técnicas de crecimiento *in vitro*, se han estudiado como bases para aumentar las potencialidades de las especies exóticas de gran interés comercial.

Dentro del marco del mejoramiento genético de la especie *Eucalyptus*, también se ha estudiado el efecto de asociaciones simbióticas, como las micorrizas, en la supervivencia y crecimiento de los árboles.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficiencia de la micorrización en plantas de micropropagadas de *Eucalyptus grandis* al momento de trasplante.

Se realizaron dos ensayos, utilizándose en uno de ellos un sustrato comercial (ensayo I) y en el otro, el mismo sustrato diluido con arena dulce (ensayo II).

Se inocularon las plantas de *Eucalyptus grandis* en tratamientos independientes con hongos ectomicorríticos, *Pisolithus tinctorius* y *Cenococcum graniforme* y con hongos endomicorríticos. También se inocularon combinaciones de los hongos ectomicorríticos con los endomicorríticos.

Las evaluaciones se realizaron al mes y a los cuatro meses y medio del trasplante de los tubos de ensayo.

Los resultados mostraron bajos porcentajes de infección por hongos ectomicorríticos en todos los tratamientos de los dos ensayos en las dos evaluaciones (con valores que oscilan entre 3% y 9%). No hubo infección por hongos endomicorríticos en ningún caso.

Los resultados de la evaluación de otros parámetros como altura, peso y supervivencia de las plantas no arrojaron grandes diferencias entre tratamientos del ensayo I pero si las presentaron con los tratamientos del ensayo II. En el análisis de la supervivencia de las plantas del ensayo II, se pudo observar una notoria superioridad en las plantas inoculadas frente a los testigos (73% vs 20%).

El alto porcentaje de supervivencia, a pesar de los bajos resultados de micorrización, podría deberse a la riqueza del sustrato, el cual proveería a las plantas los nutrientes necesarios para su desarrollo e inhibiría la formación de las micorrizas.

El implemento de una inoculación masiva comercial sería factible si se modificaran algunos aspectos de la metodología actual.

## 8. SUMMARY

Due to the great development presented by the forest sector in the past years, new methods of investigation have been implemented.

Genetic improvement programs and *in vitro* growth techniques have been studied as bases for increasing the potentialities of the exotic species of great commercial interest. In the frame of genetic improvement of the *Eucalyptus* specie, the effect of symbiotic associations, such as mycorrhizas in the survival and growth of the trees have been studied.

The present job had as an objective to evaluate the efficiency of the mycorrhizal associations in micropropagated plants of *Eucalyptus grandis* at the moment of the transplant.

Two experiments were realized, in one of the experiments a commercial substance was used (experiment I) and in the other one, the same substance diluted with sweet sand (experiment II). The plants of *Eucalyptus grandis* were inoculated in independent treatments with ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Cenococcum graniforme* and with endomycorrhizal fungi. Combinations of the ectomycorrhizal fungi were also inoculated with the endomycorrhizal.

The evaluations were carried out after a month and after four and a half months of the transplant from the test tubes.

The results showed low infection percentages for ectomycorrhizal fungi in all the treatments of the two rehearsals in the two evaluations (with values that they oscillate between 3% and 9%). There was not infection for endomycorrhizal fungi in any case.

The results of the evaluation of other parameters like height, weight and survival of the plants didn't throw big differences among treatments of the rehearsal I but yes they presented them with the treatments of the rehearsal II. In the analysis of the survival of the plants of the experiment II, one could observe a notorious superiority in the plants inoculated in front of the control (73% vs. 20%).

The high percentage of survival, in spite of the first floor mycorrhizal association results, it could be due to the wealth of the substance, which would provide to the plants the necessary nutrients for their development and it would inhibit the formation of the mycorrhizas.

Implements of a commercial massive inoculation it would be feasible if they modified some aspects of the current methodology.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. ABBOT, L.K.; and ROBSON, A.D. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agric. Ecosystems Environ*, 35:121-150.
2. ALDABALDE, R.; BUXEDAS, M.L.; LANFRANCO, M. 1997. Propagación vegetativa de genotipos seleccionados de *Eucalyptus grandis*. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Facultad de Agronomía. 100p.
3. ALVAREZ, I.F. 1991. Ecología, fisiología e implicaciones prácticas de las ectomicorrizas. *In* Fijación y movilización biológica de nutrientes. Olivares y Barea eds. Madrid, España. V. 2. pp 247-259.
4. ANDERSON, A.J. 1988. Mycorrhizae-Host specificity and recognition. Symposium: Interactions of mycorrhizal fungi. 78(3): 375-378.
5. ANTIBUS, R.K.; KROEHLER, C.J.; LINKINS, A.E. 1986. The effects of external pH, temperature, and substrate concentration on acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal Botanic* 64: 2383-2387.
6. ARINES, J. 1991. Aspectos físico-químicos de la fijación y movilización biológica en nutrientes en el suelo y su incidencia en la formación y efectos de las micorrizas VA. *In* Fijación y movilización biológica de nutrientes. Olivares y Barea eds. Madrid, España. V.2. pp 203-215.
7. ASSIS, T.; PEREIRA, O.; GONÇALVES, S.I. 1992. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. *In* Congreso Florestal Estadual, (7º, 1992, Nova Prata, RS). pp. 824-837.
8. ASSIS, T. 1996. Utilização comercial da propagação agâmica de espécies de *Eucalyptus*. *In* Jornadas Forestales de Entre Ríos, (11ª, 1996 Concordia). Concordia, INTA. pp. 10-16.
9. AZCON-AGUILAR, G. y BAREA, J.M. 1980. Micorrizas. *In* Biología vegetal. Barcelona . Prensa Científica pp 83-91.
10. BEDDIAR, A. 1984. Les possibilités d'associations symbiotiques de l'aulne glutineux dans divers sols de l'est de France. Doctoral Thesis. Université Nancy I. 78p.
11. BENNET, I.J.; McCOMB, J.A. 1982. Propagation of Jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. *Australian Forestry Research* 12: 121-127.

12. BOUGHER, N.L.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. 1989. Growth and phosphorus acquisition of Karri (*Eucalyptus diversicolor* F.Muell) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytology* 114: 77-85.
13. BROWNING, M.H.R.; and WHITNEY, R.D. 1992. The influence of phosphorus concentration and frequency of fertilization on ectomycorrhizal development in containerized black spruce and jack pine seedlings. *Canadian Journal Forestry Research* 22: 1263-1270.
14. CARPINETI, L. 1996. Propagación agámica de *Eucalyptus*. In *Jornadas Forestales de Entre Ríos, (11ª, 1996 Concordia)*. Concordia, INTA. pp. 17-29.
15. CHILVERS, G. A., PRYOR, L. D. 1965. The structure of Eucalypt mycorrhizas. *Australian Journal Botanic* 13: 245-249.
16. CHILVERS, G.A. 1968. Some distinctive types of eucalypt mycorrhiza. *Australian Journal Botanic* 16: 49-70.
17. CHILVERS, G.A.; GUST, L.W. 1982. Comparisons between the growth rates of mycorrhizas, uninfected roots and a mycorrhizal fungus of *Eucalyptus st-johnii* R.T.Bak. *New Phytology* 91: 451-466.
18. CHILVERS, G. A.; LAPEYRIE, F.F. and HORAN, D.P. 1987. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytology* 107: 441-448.
19. CORDELL, CH.E.; OWEN, J.H.; MARX, D.H. 1987. Mycorrhizae nursery management for improved seedling quality and field performance. In *Intermountain Forest Nursery Association Meeting (1987, Oklahoma City, Okla)*. pp 105-115.
20. DA CRUZ PRADELLA, J.G.; ZUCCOLO, M.; REIS LOPES, S.A.; and OLIVEIRA, M.S. 1990. *Pisolithus tinctorius* vegetative mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. *Revista Microbiológica*. 22(1): 7-11.
21. DEBERGH, P.; READ, P. 1991. Micropropagation. In *Debergh, P.; Zimmerman, R. Micropropagation, Technology and application*. Netherlands, Kluwer Academic. pp. 1-13.
22. DELORENZINI, C. 1982. Efectos de la inoculación con micorrizas vesículo-arbusculares en suelos con diferentes contenidos en fósforo. *Revista Latinoamericana Microbiológica*. 24:89-92.
23. DÍAZ, G.; and HONRUBIA, M. 1993. Respuestas de crecimiento del albardin (*Lygeum spartum* L.) a la inoculación con hongos micorrícicos y a la fertilización fosforada. *Cryptogamie, Mycology*. 14(2): 117-125.

24. FERGUSON, J.J.; and WOODHEAD, S.H. 1982. Production of endomycorrhizal inoculum. A. Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In Methods and principles of mycorrhizal research. N.C.Schenck ed. University of Florida. pp 47-58.
25. GIANINAZZI, S. 1991. Vesicular-arbuscular (endo) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agricultural Ecosystems Environnements* 35: 105-119.
26. GIANINAZZI-PEARSON, V., AZCÓN-AGUILAR, C.1991. Fisiología de las micorrizas vesículo-arbusculares. In Fijación y movilización biológica de nutrientes. Madrid. Olivares y Barea eds. Vol 2. pp 175-202.
27. GIOVANETTI, M. Y MOSSE, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytology*, 84: 489-500.
28. GRAVINA, A., MAJOR, G., PIESTUN, D. 1992. Introducción al cultivo de tejidos vegetales "in vitro". Montevideo, Facultad de Agronomía. 33p.
29. GROVE, T.; MALAJCZUK, N.; BURGESS, T.; THOMSON, B. D.; and HARDY G. 1991. Growth responses of plantation Eucalyptus to inoculation with selected ectomycorrhizal fungi. In IUFRO Symposium "Intensive Forestry: the role of Eucalyptus" (1991, Durban, South Africa) Proceedings. pp 86-93.
30. GUPTA, P.K.; MEHTA, U.J.; MASCARENHAS, A.F. 1983. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports*. 2: 296-299.
31. HAINES, R. 1994. El papel de la biotecnología en el mejoramiento de las especies forestales con referencia a los países en desarrollo. Roma, FAO. 29p (Estudio FAO Montes N° 118).
32. HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. London. In Academic Press. 483p.
33. HAYMAN, D.S. 1982. Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza Symposium*. 72(8): 1119-1124.
34. HAYMAN, D.S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal Botanic* 61:944-963.
35. HORAN, D.P.; CHILVERS, G.A.; and LAPEYRIE, F.F. 1988. Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytology* 109: 451-458.
36. HONRUBIA, M.; TORRES, P.; DIAZ, G.; CANO, A. 1992. Micorrización. In Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Murcia, ICONA 44p.(Monografía 54).

37. IRISITY, F.; IRURETA, F. 1996. Micorrización de plantines de *Eucalyptus grandis* producidos en viveros comerciales del Uruguay, y su relación con prácticas de producción. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Facultad de Agronomía. 55p.
38. JEFFRIES, P.; and DODD, J.C., 1991. The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. In Handbook of Applied Mycology, Arora, D. K., Rai, B., Mukerji, K.C.T., and Knudsen, F.R. (eds) Vol. 1, pp. 155-1186.
39. KOIDE, R.T. 1991. Tansley Review nº29. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. New Phytology 117: 365-386.
40. KOSKE, R.E. y GEMMA, J.N. 1989. A modified procedure for straining roots to detect VA mycorrhizas. Mycological Research, 92: 486-505.
41. KOZLOVIZ, P.; LOPEZ, I.; VOLTOLINI, G. 1997. Determinación del porcentaje de micorrización en árboles y plantines de *Eucalyptus grandis* de diferentes edades para dos localidades. Tesis Ing. Agr. Montevideo. Uruguay. Facultad de Agronomía. 128p.
42. KROPP, B. R.; and LANGLOIS, CH-G. 1990. Ectomycorrhizae in reforestation. Canadian Journal Forestry Research 20:438-451.
43. LAPEYRIE, F.F.; and BRUCHET, G., 1985. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. New Phytology 100: 585-593.
44. LAPEYRIE, F.F.; CHILVERS, G.A. 1985. An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. New Phytology 100: 93-104.
45. LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; and MICHELOT, P. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor end entrapped in polymeric gels. Canadian Journal Botanic 63: 1664-1668.
46. LODGE, J.; and WENTWORTH, T.R. 1990. Negative associations among VA. mycorrhizal fungi and some ectomycorrhizal fungi inhabiting the same root system. OIKOS 5:347-356.
47. MALAJCZUK, N.; and HARTNEY, V.J. 1986. Procedure for inoculation of micropropagated plantlets of *Eucalyptus camaldulensis* with ectomycorrhizal fungi and comparison with seedling inoculation using inoculum contained in a peat/vermiculite carrier. Australian Forestry Research 16: 199-206.
48. MALVAREZ, G.; MAJOR, G.; CURBELO, V.; and FRIONI, L. 1997. Hongos ectomicorríticos en *Eucalyptus grandis*. Agrociencia V 1(1): 38-43.

49. MARGARA, J. 1984. Bases de la multiplicación vegetativa. Les méristèmes et l'organogénèse. Paris, INRA. 262p.
50. MARTINS, A.; BARROSO, J.; and PAIS, M.S. 1996. Effects of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* mill. *Mycorrhiza* 6:265-270.
51. MARX, D.H.; KRUPA, S.V. 1978. Ectomycorrhizae. In: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Dommergues, Y.R. y Krupa, S.V. (eds.). Amsterdam, Elsevier Scientific pp. 373-375.
52. MARX, D.H.; and KENNEY, D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In Methods and principles of mycorrhizal research. N.C.Schenck ed. University of Florida. pp 131-146.
53. MARX, D. H.; et al. 1982. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forrestry Science* 28(2): 373-400.
54. MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; 1989. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In Biotechnology of fungi for improving plant growth, Whipps, J.M, and Lumsden, R.D (eds), pp1-24.
55. MARX, D.H. 1991. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In Marcus Wallenberg Prize Symposium (1991, Stockholm, Sweden). Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees. Proceedings. pp. 54-90.
56. McGONIGLE, T.P.; and FITTER, A.H. 1990. Ecological specificity of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations. *Mycological Research* 94(1): 120-122.
57. MENGE, J.A.; LABANAUSKAS, C.K.; JOHNSON, E.L.V.; and PLATT, R.G. 1978. Partial substitution of mycorrhizal fungi for phosphorus fertilization in the greenhouse culture of citrus. *Soil Science Society American Journal* 42: 926-930.
58. MEGUMI, M.C. 1988. Seleção de fungos ectomicorrizicos para utilização em programas de micorrização controlada em Pinus: Estudos ecológicos e fisiológicos em síntese "in vitro". Tesis. Viçosa, M G, Janeiro, Brasil. 48p.
59. MEHRA-PALTA, A. 1982. Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. *Plant. Science Letters*, 26: 1-11.
60. MIRANDA, J.C.C.; HARRIS, P.J.; and WILD, A. 1989. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. *New Phytology* 112:410.

61. MOSSE, B. 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytology* 72: 127-136.
62. MULLETTE, K.J. 1976. Studies of Eucalypt Mycorrhizas. A method of mycorrhiza induction in *Eucalyptus gummifera* (Gaertn & Hochr) by *Pisolithus tinctorius* (Pers). *Australian Journal Botanic* 24: 193-200.
63. PÉREZ GOMAR, I.; TRUJILLO, M. 1995. Estudio preliminar sobre embriogénesis somática en *Eucalyptus grandis*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 61p.
64. PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. 2 ed. Netherlands, Martinus Nijhoff. 334p.
65. PIROZINSKY, K.A.; y MALLOCH, D.W., 1975. The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6: 153-164.
66. POISSONNIER, M. 1986. Mycorrhisation in vitro de clones d'Eucalyptus. Note de laboratoire. AFOCEL, Annales Recherches Sylvicoles. 81-93.
67. POISSONNIER, M. 1990. Etude expérimentale de la mycorrhisation in vitro de clones d'Eucalyptus. AFOCEL, Annales Recherches Sylvicoles. 59-90.
68. PREECE, J.; SUTTER, E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In Debergh, P.; Zimmerman, R. *Micropropagation, Technology and application*. Netherlands, Kluwer Academic. pp. 71-93.
69. QUINTOS, M.; and VALDES, M. 1987. El desarrollo de micorriza y el crecimiento de plántulas de pino real (*Pinus engelmannii*) al inocularse con *Pisolithus tinctorius*. *Review Latinoamerican Microbiology* 29: 189-192.
70. RAI, R. 1988. Interaction response of *Glomus albidus* and *Cicer-Rhizobium* strains on iron uptake and symbiotic nitrogen fixation in calcareous soil. *Journal Plant Nutrition* 11: 863-869.
71. READ, D.J.; KIANMEHR, H.; and MALIBARI, A. 1977. The biology of mycorrhiza in *Helianthemum* Mill. *New Phytology*. 78:305-312.
72. READ, D.J. 1991. Mycorrhizal fungi in natural and semi-natural plant communities. In Marcus Wallenberg Prize Symposium (1991, Stockholm, Sweden). *Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees*. Proceedings. pp. 27-53.
73. SAFIR, G.R.; and DUNIWAY, J.M. 1982. Evaluation of plant response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. B. Environmental variables. In *Methods and principles of mycorrhizal research*. N.C.Schenck ed. University of Florida. pp 77-83.

74. SANDERS, F.E.; BUWALDA, J.G.; and TINKER, P.B. 1983. A note on modelling methods for studies of ectomycorrhizal systems. *Plant & soil*, 71: 507-512.
75. SASSON, A. 1988. La micropropagation des plantes: réalité et priorité. *Biofutur*. 111:34-38.
76. SIEVERDING, E.; and BAREA, J.M. 1991. Perspectivas de la inoculación de sistemas de producción vegetal con hongos formadores de micorrizas VA. In *Fijación y movilización biológica de nutrientes*. Madrid, España. Olivares y Barea eds. V2 pp 221-246.
77. SMITH, S.E.; ST JONES, B.J.; SMITH, F.A.; NICHOLAS, D.J. 1985. Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol*, 99: 211-227.
78. SMITH, S.E.; and GIANINAZZI-PEARSON, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:221-244.
79. SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; and BELLET, M.M. 1990. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de Eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo, Campinas*. 14:327-332.
80. SÖDERSTRÖM, B. 1991. The fungal partner in the mycorrhizal symbiosis. In *Marcus Wallenberg Prize Symposium (1991, Stockholm, Sweden). Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees*. Proceedings.pp. 5-26.
81. TATE, K.R. 1984. The biological transformation of P in soil. *Plant and Soil* 76: 245-256.
82. THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. In *Debergh, P.; Zimmerman, R. Micropropagation, Technology and application*. Netherlands, Kluwer Academic. pp. 311-336.
83. TONKIN, C.M.; MALJCZUK, N.; and MC COMB, J.A. 1988. Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. *New Phytology*. 11:209-214.
84. TRAPPE, J.M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries, *Annal Research Phytopathology*., 15: 203-222.
85. WALLANDER, H.; and NYLUND, J.E. 1991. Effects of excess nitrogen on carbohydrate concentration and mycorrhizal development of *Pinus sylvestris* L. seedlings. *New Phytology*. 119: 405-411.

86. WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. 1991. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. *Plant Cell Reports*. 9: 586-589.
87. ZOBEL, B.; TALBERT, J. 1992. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. México, Limusa. 545p.

## **10. ANEXO**

**MEDIO MINERAL MS (MURAHIGE Y SKOOG, 1962)**

COMPUESTO	g/L de SOLUCIÓN STOCK
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165.0000
KNO <sub>3</sub>	190.0000
MgSO <sub>4</sub>	18.0700
MnSO <sub>4</sub>	1.6900
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.8600
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.0025
CaCL <sub>2</sub>	33.2000
KI	0.0830
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.0025
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.0000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.6200
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.0250
Na <sub>2</sub> EDTA	3.7300
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.7800

Se utilizan 10ml de solución stock /L de medio de cultivo (MS completo). En el trabajo se utilizó el MS con la concentración reducida a la mitad.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL PORCENTAJE DE MICORRIZACIÓN

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	4	C2 ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23

Number of observations in by group = 19

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: L\_POR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	3	12.2288128	4.0762709	6.87
0.0039				
Error	15	8.8990563	0.5932704	
Corrected Total	18	21.1278691		

L_POR Mean	R-Square	C.V.	Root MSE
1.47676	0.578800	52.15733	0.77024

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	3	12.2288128	4.0762709	6.87
0.0039				

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure  
Least Squares Means

TRAT	L_POR LSMEAN	Pr >  T  H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)				
		i/j	1	2	3	4
C2	2.69909669	1 .	0.0012	0.0603	0.0016	
ENDO-C2	0.76059782	2 0.0012	.	0.1060	0.8845	
ENDO-PT2	1.64927470	3 0.0603	0.1060	.	0.1348	
PT23	0.83258747	4 0.0016	0.8845	0.1348	.	

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated

with pre-planned comparisons should be used.

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: L\_POR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the

experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 15 MSE= 0.59327

Critical Value of T= 2.13

Least Significant Difference= 1.0703

WARNING: Cell sizes are not equal.

Harmonic Mean of cell sizes= 4.705882

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	2.6991	5	C2
A			
B	1.6493	4	ENDO-PT2
B			
B	0.8326	5	PT23
B			
B	0.7606	5	ENDO-C2

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	6	C2 C2* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*

Number of observations in by group = 61

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: L\_POR

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	5	6.76465748	1.35293150	14.57
0.0001				
Error	55	5.10779958	0.09286908	
Corrected Total	60	11.87245706		

L_POR Mean	R-Square	C.V.	Root MSE
1.78867	0.569777	17.03753	0.30474

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	5	6.76465748	1.35293150	14.57
0.0001				

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure  
Least Squares Means

TRAT	L_POR LSMEAN	Pr >  T  i/j	H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)	1	2	3	4	5	6
C2	2.23647670	1 .	0.0001	0.1139	0.0085	0.0001			
C2*	1.30511357	2 0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0095			
ENDO-C2	2.03213490	3 0.1139	0.0001	.	0.2585	0.0046			
ENDO-PT2	1.88010238	4 0.0085	0.0001	0.2585	.	0.0913			
PT23	1.65584495	5 0.0001	0.0095	0.0046	0.0913	.			
PT23*	1.36584543	6 0.0001	0.7010	0.0001	0.0019	0.0622			

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure  
T tests (LSD) for variable: L\_POR

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 55 MSE= 0.092869  
Critical Value of T= 2.00  
Least Significant Difference= 0.2786  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 9.61165

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	2.2365	12	C2
A			
B	2.0321	11	ENDO-C2
B			
B	1.8801	10	ENDO-PT2
C			
C	1.6558	12	PT23
D			
D	1.3658	6	PT23*
D			
D	1.3051	10	C2*

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PESOS SECOS

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	6	C2 ENDO ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 TESTIGO

Number of observations in by group = 29

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: PESO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	5	0.98907429	0.19781486	2.16
0.0943				
Error	23	2.10771362	0.09163972	
Corrected Total	28	3.09678791		

	R-Square	C.V.	Root MSE
PESO Mean			
	0.319387	50.78440	0.30272
0.59609			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	5	0.98907429	0.19781486	2.16
0.0943				

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure  
Least Squares Means

TRAT	PESO LSMEAN	Pr >  T  i/j	H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)					
			1	2	3	4	5	
6								
C2 0.2798	0.79882000	1 .	0.2121	0.0338	0.0496	0.7941		
ENDO 0.8613	0.55306000	2 0.2121 .		0.3407	0.3976	0.1354		
ENDO-C2 0.2621	0.36678000	3 0.0338 0.3407 .			0.9564	0.0191		
ENDO-PT2 0.3143	0.37800000	4 0.0496 0.3976 0.9564 .				0.0295		
PT23 0.1837	0.84936000	5 0.7941 0.1354 0.0191 0.0295 .						
TESTIGO	0.58690000	6 0.2798 0.8613 0.2621 0.3143 0.1837						

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated with pre-planned comparisons should be used.

FECH=FECH1

General Linear Models Procedure  
T tests (LSD) for variable: PESQ

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 23 MSE= 0.09164  
Critical Value of T= 2.07  
Least Significant Difference= 0.4042  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 4.8

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	0.8494	5	PT23
A			
A	0.7988	5	C2
A			
B	0.5869	5	TESTIGO
B			
B	0.5531	5	ENDO
B			
B	0.3780	4	ENDO-PT2
B			
B	0.3668	5	ENDO-C2

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	10	C2 C2* ENDO ENDO* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*
TESTIGO		TESTIGO*

Number of observations in by group = 99

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: PESO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	9	636.445953	70.716217	38.94
0.0001				
Error	89	161.636536	1.816141	
Corrected Total	98	798.082489		

PESO Mean	R-Square	C.V.	Root MSE
5.08251	0.797469	26.51528	1.34764

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	9	636.445953	70.716217	38.94
0.0001				

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure  
Least Squares Means

TRAT	PESO LSMEAN	LSMEAN Number
C2	7.24965000	1
C2*	1.34106364	2
ENDO	5.76968000	3
ENDO*	1.21277778	4
ENDO-C2	6.21552500	5
ENDO-PT2	8.23536000	6
PT23	6.10886667	7
PT23*	1.20183333	8
TESTIGO	6.50776429	9
TESTIGO*	1.41450000	10

Pr > |T| H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1	.	0.0001	0.0120	0.0001	0.0634	0.0911	0.0410	0.0001
2	0.0001	.	0.0001	0.8328	0.0001	0.0001	0.0001	0.8392
3	0.0120	0.0001	.	0.0001	0.4418	0.0001	0.5581	0.0001
4	0.0001	0.8328	0.0001	.	0.0001	0.0001	0.0001	0.9877
5	0.0634	0.0001	0.4418	0.0001	.	0.0007	0.8467	0.0001
6	0.0911	0.0001	0.0001	0.0001	0.0007	.	0.0004	0.0001
7	0.0410	0.0001	0.5581	0.0001	0.8467	0.0004	.	0.0001
8	0.0001	0.8392	0.0001	0.9877	0.0001	0.0001	0.0001	.
9	0.1652	0.0001	0.1893	0.0001	0.5829	0.0026	0.4538	0.0001
10	0.0001	0.9335	0.0001	0.8229	0.0001	0.0001	0.0001	0.8239

Pr > |T| H0: LSMEAN(i)=LSMEAN(j)

i/j	9	10
1	0.1652	0.0001
2	0.0001	0.9335
3	0.1893	0.0001
4	0.0001	0.8229
5	0.5829	0.0001
6	0.0026	0.0001
7	0.4538	0.0001
8	0.0001	0.8239
9	.	0.0001
10	0.0001	.

NOTE: To ensure overall protection level, only probabilities associated

with pre-planned comparisons should be used.

FECH=FECH2

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: PESO

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the  
the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 89 MSE= 1.816141  
Critical Value of T= 1.99  
Least Significant Difference= 1.3246  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 8.173616

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
	A	8.2354	10 ENDO-PT2
	A		
B	A	7.2497	12 C2
B			
B	C	6.5078	14 TESTIGO
B	C		
B	C	6.2155	12 ENDO-C2
B	C		
B	C	6.1089	12 PT23
	C		
	C	5.7697	10 ENDO
	D	1.4145	3 TESTIGO*
	D		
	D	1.3411	11 C2*
	D		
	D	1.2128	9 ENDO*
	D		
	D	1.2018	6 PT23*

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS ALTURAS

FECH=07-Nov

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	10	C2 C2* ENDO ENDO* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*
TESTIGO		TESTIGO*

Number of observations in by group = 155

FECH=07-Nov

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ALT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	9	75.8325554	8.4258395	7.29
0.0001				
Error	145	167.5638317	1.1556126	
Corrected Total	154	243.3963871		

	R-Square	C.V.	Root MSE
ALT Mean			
2.98323	0.311560	36.03463	1.07499

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	9	75.8325554	8.4258395	7.29
0.0001				

FECH=07-Nov

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: ALT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 145 MSE= 1.155613  
Critical Value of T= 1.98  
Least Significant Difference= 0.7745  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 15.04973

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
	A	3.8333	15 ENDO-PT2
	A		
	A	3.7824	17 C2
	A		
	A	3.6813	16 ENDO-C2
	A		
B	A	3.3250	20 TESTIGO
B	A		
B	A	3.2000	17 PT23
B			
B	C	2.8368	19 ENDO
	C		
D	C	2.4167	12 ENDO*
D	C		
D	C	2.1857	14 C2*
D			
D		1.9923	13 TESTIGO*
D			
D		1.7833	12 PT23*

FECH=15-Feb

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	10	C2 C2* ENDO ENDO* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*
TESTIGO		TESTIGO*

Number of observations in by group = 99

FECH=15-Feb

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ALT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	9	6616.69686	735.18854	43.24
0.0001				
Error	89	1513.10395	17.00117	
Corrected Total	98	8129.80081		

	R-Square	C.V.	Root MSE
ALT Mean			
40.1717	0.813882	10.26406	4.12325

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	9	6616.69686	735.18854	43.24
0.0001				

FECH=15-Feb

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: ALT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 89 MSE= 17.00117  
Critical Value of T= 1.99  
Least Significant Difference= 4.0502  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 8.183751

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
	A	47.800	12 C2
	A		
B	A	46.850	10 ENDO-PT2
B	A		
B	A C	46.575	12 PT23
B	A C		
B	A C	45.200	11 ENDO-C2
B	C		
B	C	43.129	14 TESTIGO
	C		
	C	42.736	11 ENDO
	D	29.009	11 C2*
	D		
	D	27.667	9 ENDO*
	D		
	D	26.467	6 PT23*
	D		
	D	26.000	3 TESTIGO*

FECH=26-Dec

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	10	C2 C2* ENDO ENDO* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*
TESTIGO		TESTIGO*

Number of observations in by group = 128

FECH=26-Dec

General Linear Models Procedure  
Dependent Variable: ALT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	9	1221.36843	135.70760	6.73
0.0001				
Error	118	2379.41157	20.16450	
Corrected Total	127	3600.78000		
ALT Mean	R-Square	C.V.	Root MSE	
	0.339196	28.15355	4.49049	
15.9500				

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	9	1221.36843	135.70760	6.73
0.0001				

FECH=26-Dec

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: ALT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 118 MSE= 20.1645  
 Critical Value of T= 1.98  
 Least Significant Difference= 4.1112  
 WARNING: Cell sizes are not equal.  
 Harmonic Mean of cell sizes= 9.356923

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
	A	20.343	14 ENDO-PT2
	A		
B	A	19.147	17 C2
B	A		
B	A	17.684	19 TESTIGO
B	A		
B	A	16.425	16 ENDO-C2
B			
B	C	15.706	17 PT23
B	C		
B	C D	15.075	16 ENDO
	C D		
	C D	11.818	11 C2*
	C D		
E	C D	11.650	6 PT23*
E	D		
E	D	11.289	9 ENDO*
E			
E		7.600	3 TESTIGO*

FECH=26-Nov

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	10	C2 C2* ENDO ENDO* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*
TESTIGO		TESTIGO*

Number of observations in by group = 128

FECH=26-Nov

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ALT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	9	208.961642	23.217960	5.16
0.0001				
Error	118	530.613358	4.496723	
Corrected Total	127	739.575000		
	R-Square	C.V.	Root MSE	
ALT Mean	0.282543	46.16159	2.12055	
4.59375				

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	9	208.961642	23.217960	5.16
0.0001				

FECH=26-Nov

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: ALT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 118 MSE= 4.496723  
Critical Value of T= 1.98  
Least Significant Difference= 1.9414  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 9.356923

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
	A	6.8071	14 ENDO-PT2
	A		
B	A	5.6706	17 C2
B	A		
B	A	5.2211	19 TESTIGO
B	A		
B	A	4.9563	16 ENDO-C2
B			
B	C	4.4625	16 ENDO
B	C		
B	C D	3.9882	17 PT23
	C D		
	C D	2.8556	9 ENDO*
	C D		
	C D	2.8364	11 C2*
	C D		
	C D	2.5833	6 PT23*
	D		
	D	2.0667	3 TESTIGO*

FECH=28-Jan

General Linear Models Procedure  
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	10	C2 C2* ENDO ENDO* ENDO-C2 ENDO-PT2 PT23 PT23*
TESTIGO		TESTIGO*

Number of observations in by group = 116

FECH=28-Jan

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: ALT

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Pr > F				
Model	9	3657.56711	406.39635	5.75
0.0001				
Error	106	7488.39427	70.64523	
Corrected Total	115	11145.96138		

	R-Square	C.V.	Root MSE
ALT Mean			
32.7586	0.328152	25.65759	8.40507

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value
Pr > F				
TRAT	9	3657.56711	406.39635	5.75
0.0001				

FECH=28-Jan

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: ALT

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the  
experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 106 MSE= 70.64523  
Critical Value of T= 1.98  
Least Significant Difference= 7.8881  
WARNING: Cell sizes are not equal.  
Harmonic Mean of cell sizes= 8.925642

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	37.533	15	PT23
A			
A	37.307	15	C2
A			
A	37.058	12	ENDO-PT2
A			
A	35.629	17	TESTIGO
A			
A	34.914	14	ENDO-C2
A			
A	32.850	14	ENDO
B			
B	24.400	11	C2*
B			
B	23.667	9	ENDO*
B			
B	22.067	3	TESTIGO*
B			
B	21.783	6	PT23*