

T. 3090


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE DIFERENTES DOSIS DE FERTILIZACIÓN EN LA
PRODUCCIÓN DE PLANTINES DE *Eucalyptus grandis* w. Hill ex Maiden
CRECIENDO EN SUSTRATO COLONIZADO POR *Trichoderma harzianum*.

por

FACULTAD DE AGRONOMIA
RAQUEL Y. TEJERA VILLALBA
DIBLIOTECA

Rosina CABRERA COSCO
Raquel Y. TÉJERA VILLALBA

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2002

Tesis aprobada por:

Director:

Ing Agr. Graciela Romero

Ing. Agr. Alicia Crosara

Ing. Agr. Amalia Baraibar

Fecha:

Autores:

Rosina Cabrera Cosco

Raquel Tejera Villalba

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, especialmente a: COLONVADE S.A., Vivero "Buena Union", Laboratorio LAGE & CIA S.A., Ing. Agr. Amalia Baraibar, Ing. Agr. Alicia Crosara, Ing. Agr. Juan P. Posse Ing. Agr. Graciela Romero, Personal del vivero

TABLA DE CONTENIDO

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>OBJETIVOS</u>	4
2.1 OBJETIVO GENERAL	4
2.2 OBJETIVO ESPECIFICO	4
3. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	5
3.1 <u>PRODUCCIÓN DE PLANTINES DE <i>Eucalyptus grandis</i> w. Hill ex Maiden</u>	5
3.1.1 <u>Introducción</u>	5
3.1.2 <u>Ciclo productivo</u>	6
3.1.3 <u>Calidad de planta</u>	7
3.1.3.1 Concepto de calidad de planta	7
3.1.3.2 Parámetros que definen la calidad de planta	8
3.2 NUTRICION DE PLANTINES	13
3.3 SANIDAD DE PLANTINES	18
3.3.1 <u>Problemática de <i>Botrytis cinerea</i> en viveros forestales</u>	18
3.3.1.1 Descripción	19
3.3.1.2 Desarrollo de la enfermedad	20
3.3.1.3 Condiciones predisponentes para el desarrollo del patógeno	24
3.3.2 <u>Manejo sanitario del vivero</u>	25
3.3.3 <u>Agentes de control biológico como herramienta del control integrado de</u> <u><i>Botrytis cinerea</i> en viveros de <i>Eucalyptus</i></u>	27
3.3.3.1 Generalidades del Control Biológico	27
3.3.3.2 <i>Trichoderma</i> spp.	29
3.3.3.3 Mecanismos que actúan en el antagonismo	32
3.3.3.4 Factores determinantes para el desarrollo de <i>Trichoderma</i>	38

3.3.3.5 Necesidades nutricionales.	41
3.3.3.6 Efecto sobre el hospedero.	43
3.3.3.7 Forma de inclusión de Trichoderma en el Sistema sustrato-plantín.	49
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	52
4.1 MATERIALES.	52
4.2 MÉTODOS.	54
4.2.1 <u>Descripción del ensayo.</u>	54
4.2.1.1 Sustrato.	56
4.2.1.2 Siembra.	56
4.2.1.3 Fertilización.	56
4.2.2 <u>Medidas realizadas.</u>	57
4.2.2.1 Medidas realizadas en la planta.	57
4.2.2.1 Medidas realizadas en el sustrato.	58
4.3 DISEÑO ESTADÍSTICO DEL ENSAYO.	59
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	59
5. RESULTADOS.	60
5.1 RESULTADOS DE LAS MEDIDAS REALIZADAS EN LA PLANTA.	61
5.1.1 <u>Parámetros morfológicos.</u>	61
5.1.1.1 Altura.	61
5.1.1.2 Diámetro a la altura del cuello.	63
5.1.1.3 Peso seco de parte aérea.	64
5.1.1.4 Peso seco de la raíz.	66
5.1.2 <u>Incidencia de la enfermedad causada por <i>Botrytis cinerea</i>.</u>	67
5.1.3 <u>Análisis foliar.</u>	69
5.1.3.1 Macronutrientes.	70
5.1.3.2 Micronutrientes.	76
5.2 RESULTADO DE LAS MEDIDAS REALIZADAS EN EL SUSTRATO.	78
5.2.1 <u>Análisis químicos del sustrato de partida.</u>	78
5.2.2 <u>Análisis químicos del sustrato en el primer y segundo muestreo.</u>	79

5.2.2.1 Carbono.	79
5.2.2.2 Relación carbono/nitrógeno.	81
5.2.2.3 Macronutrientes.	82
5.2.2.4 Micronutrientes.	90
5.2.2.5 PH.	92
5.2.2.6 Conductividad.	93
5.2.3 <u>Conteo de colonias de <i>Trichoderma harzianum</i></u>	95
6. <u>DISCUSIÓN</u>	97
6.1 CALIDAD DE PLANTINES.	97
6.1.1 <u>Parámetros morfológicos</u>	97
6.1.2 <u>Parámetros fisiológicos</u>	101
6.2 SANIDAD DE PLANTINES.	104
6.3 CONTEO DE COLONIAS DE <i>Trichoderma harzianum</i> EN EL SUSTRATO.	108
7. <u>CONCLUSIÓN</u>	111
8. <u>RESUMEN</u>	113
9. <u>SUMMARY</u>	115
10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	117
11. <u>ANEXOS</u>	128

INDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS

Cuadro N° 1: <i>Concentraciones foliares de nutrientes en plantines de Eucalyptus grandis, creciendo bajo invernáculo.</i>	17
Cuadro N° 2: <i>Requerimientos de nutrientes para plantines de Eucalyptus spp.</i>	18
Cuadro N°3: <i>Dosis de fertilizaciones por tratamiento.</i>	55
Cuadro N° 4: <i>Cantidades agregadas de macronutrientes según tratamiento en las diferentes etapas del cultivo.</i>	55
Cuadro N° 5: <i>Datos promedio de la altura de los plantines de Eucalyptus grandis en el primer y segundo muestreo.</i>	61
Cuadro N° 6: <i>Datos promedio del diámetro a la altura del cuello en plantines de Eucalyptus grandis, en el primer y segundo muestreo.</i>	63
Cuadro N° 7: <i>Datos promedio de peso seco foliar en plantines de Eucalyptus grandis en el primer y segundo muestreo.</i>	65
Cuadro N° 8: <i>Datos promedio de peso seco de raíz en plantines de Eucalyptus grandis, en el primer y segundo muestreo.</i>	66
Cuadro N° 9: <i>Incidencia de la enfermedad causada por Botrytis cinerea en plantines de Eucalyptus grandis.</i>	68
Cuadro N° 10: <i>Contenido promedio de nitrógeno foliar para el primer y segundo muestreo.</i>	70
Cuadro N° 11: <i>Contenido promedio de fósforo foliar en el primer y segundo muestreo.</i>	71
Cuadro N° 12: <i>Contenido promedio de potasio foliar en el primer y segundo muestreo.</i>	73
Cuadro N° 13: <i>Contenido promedio de calcio foliar en el primer y segundo muestreo.</i>	74

Cuadro N° 14: Contenido promedio de magnesio foliar en el primer y segundo muestreo.	75
Cuadro N° 15: Contenido promedio de los micronutrientes evaluados en el primer y segundo muestreo.	78
Cuadro N° 16: Análisis químico del Sustrato utilizado en la siembra.	79
Cuadro N° 17: Contenido promedio de carbono en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	80
Cuadro N° 18: Valor promedio de la relación carbono/nitrógeno en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	81
Cuadro N° 19: Contenido promedio de nitrógeno en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	83
Cuadro N° 20: Contenido promedio de fósforo en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	84
Cuadro N° 21: Contenido promedio de potasio en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	86
Cuadro N° 22: Contenido promedio de calcio en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	87
Cuadro N° 23: Contenido promedio de magnesio en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	89
Cuadro N° 24: Contenido promedio de los micronutrientes en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	90
Cuadro N° 25: Valor promedio de pH en el primer y segundo muestreo.	92
Cuadro N° 26: Valor promedio de conductividad en el primer y segundo muestreo.	94
Cuadro N° 27: Número promedio de colonias de <i>Trichoderma harzianum</i> en el sustrato para el primer y segundo muestreo.	95
Cuadro N° 28: Dinámica de los nutrientes en el Sistema sustrato-planta.	103
Cuadro N° 29: Contenido de nutrientes promedios de los tratamientos 1y 2.	104

Gráfica N° 1: <i>Altura de los plantines según el momento de muestro</i>	62
Gráfica N° 2: <i>Diámetro a la altura del cuello en el primer y segundo muestreo</i>	64
Gráfico N° 3: <i>Peso seco de parte aérea en el primer y segundo muestreo</i>	65
Gráfica N° 4: <i>Peso seco radicular en el primer y segundo muestreo</i>	67
Gráfica N° 5: <i>Incidencia de la enfermedad según tratamiento</i>	68
Gráfica N° 6: <i>Desarrollo de la enfermedad a lo largo del ciclo productivo</i>	69
Gráfica N° 7: <i>Contenido de nitrógeno en los plantines de Eucalyptus grandis según el momento de muestreo</i>	71
Gráfica N° 8: <i>Contenido de fósforo en los plantines de Eucalyptus grandis según el momento de muestreo</i>	72
Gráfica N° 9: <i>Contenido de potasio en plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	73
Gráfica N° 10: <i>Contenido de calcio en los plantines de Eucalyptus grandis en el primer y segundo muestreo</i>	75
Gráfica N° 11: <i>Contenido de magnesio en plantines de Eucalyptus grandis en el primer y segundo muestreo</i>	76
Gráfica N° 12: <i>Contenido de carbono en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	80
Gráfica N° 13: <i>Valor de la relación carbono/nitrógeno en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	82
Gráfica N° 14: <i>Contenido de nitrógeno en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	83
Gráfica N° 15: <i>Contenido de fósforo en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	85
Gráfica N° 16: <i>Contenido de potasio en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	86
Gráfica N° 17: <i>Contenido de calcio en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento</i>	88

Gráfica N° 18: Contenido de magnesio en el sustrato utilizado para la producción de plantines de <i>Eucalyptus grandis</i> según tratamiento.....	89
Gráfica N° 19: Contenido de manganeso en el sustrato utilizado para la producción de plantines de <i>Eucalyptus grandis</i> según tratamiento.....	91
Gráfica N° 20: Contenido de zinc en el sustrato utilizado para la producción de plantines de <i>Eucalyptus grandis</i> según tratamiento.....	92
Gráfica N° 21: Valor del pH en el sustrato utilizado para la producción de plantines de <i>Eucalyptus grandis</i> según tratamiento.....	93
Gráfica N° 22: Conductividad del sustrato utilizado para la producción de plantines de <i>Eucalyptus grandis</i> según tratamiento.....	94
Gráfica N° 23: Número promedio de colonias de <i>Trichoderma harzianum</i> en el sustrato para el primer y segundo muestreo.....	96
Gráfica N° 24: Efecto de las dosis de nutrientes en la altura de plantines de <i>Eucalyptus grandis</i>	100
Gráfica N° 25: Efecto de las dosis de nutrientes en el diámetro a la altura del cuello en plantines de <i>Eucalyptus grandis</i>	100
Gráfica N° 26: Peso seco aéreo según nutrientes totales agregados.....	101
Gráfica N° 27: Incidencia de la enfermedad causada por <i>Botrytis cinerea</i> según la altura de los plantines.	107
Gráfica N° 28: Incidencia según los nutrientes agregados (N P K).....	108
Gráfica N° 29: Variación del número de colonias según los macronutrientes agregados.	109

1. INTRODUCCIÓN

La actividad productiva que ha caracterizado a nuestro país es la agropecuaria, ocupando por mucho tiempo el sector forestal una posición marginal con respecto a las demás actividades. Este sector comienza a cobrar importancia a partir del año 1989 con la creación de la Ley Forestal, Ley 15.939 y es a través de la implementación de políticas forestales que se ha producido un incremento en el desarrollo de la forestación a nivel nacional, trayendo como resultado, un gran aumento de la superficie forestada y un fuerte dinamismo en zonas del país hasta ese momento relegadas.

Actualmente la superficie forestada es de 1:350.000 ⁽¹⁾ has, de las cuales 531.876 ⁽¹⁾ has se encuentran ocupadas por bosques artificiales con fines industriales. Dichas masas boscosas han sido implantadas fundamentalmente con el género *Eucalyptus*, del cual ciertas especies han demostrado gran adaptabilidad a nuestro medio, con rápido crecimiento y una apertura a un mercado prometedor. La especie *Eucalyptus grandis* es la que ocupa mayor superficie dentro de la zona norte del país, encontrándose en dicha región las condiciones más apropiadas para su óptimo desarrollo.

Por lo anteriormente mencionado, la producción de plantines se ha visto altamente incrementada. Los mismos son producidos en cortos periodos de tiempo y bajo condiciones favorables para un buen crecimiento y calidad de planta, pero también se dan condiciones óptimas para el desarrollo de enfermedades. Una de las más importante, por las pérdidas que origina, es la

¹ Datos aportados por Dirección Forestal. Superficie forestada bajo proyecto, período 1975-2001. actualización abril 2002.

enfermedad denominada "moho gris de los *Eucalyptus*", causada por el hongo *Botrytis cinerea* Pers ex Pers.

Como consecuencia de una variada gama de factores que interactúan entre sí, el control de *Botrytis cinerea* resulta, año tras año, ser más problemático. Entre estos factores cabe destacar: el desarrollo progresivo de resistencia por parte de cepas de *Botrytis*, a los fungicidas tradicionalmente usados con este fin, así como la cada vez más limitada oferta de nuevas moléculas de fungicidas para su control.

En el mundo entero, es cada vez más creciente el interés de incluir el empleo de agentes de control biológico en programas de manejo integrado de enfermedades, con el objetivo de disminuir el empleo de agroquímicos, de lograr un eficiente control de patógenos y disminuir la aparición de nuevas razas más virulentas. *Botrytis*, ha sido uno de los patógenos que más ha convocado el interés de empleo de agentes de control biológico, por la variedad de huéspedes en los que se ve involucrado su daño.

En el área forestal en nuestro país, se ha comenzado a estudiar la posibilidad de incluir *Trichoderma* como agente de control biológico de hongos de suelo en los sustratos de viveros. Algunas cepas de *Trichoderma* han demostrado efectivo control de *Botrytis*, además de otros patógenos de importancia. *Trichoderma* se desarrolla muy bien, en sustratos que fabrican los viveristas. Las aplicaciones se efectúan al inicio de la siembra y de ser necesario, se complementan durante el desarrollo del cultivo como aplicación foliar. La información existente hasta el momento señala que si bien no se pueden prescindir de los productos químicos, la inclusión de un agente de biocontrol, aumentaría la eficiencia del control del patógeno, podría permitir reducir dosis y disminuir las posibilidades de generar resistencia.

La inclusión de un agente de control biológico como *Trichoderma*, en el Sistema sustrato-plantín, supone cambios en la dinámica de nutrientes disponibles para el plantín, ya que por el hecho de ser un microorganismo, consume los mismos nutrientes y en forma más eficiente. Esto genera o podría generar, situaciones de inmovilización total o parcial de los elementos disponibles, acarreando deficiencias nutricionales en el plantín, por fenómenos de inmovilización temporal. Esta área de estudio es muy novedosa y existe muy poca información disponible de respaldo.

Se reportaron antecedentes en trabajos nacionales con respecto de la inmovilización de nutrientes y pérdidas de calidad de plantín, debida a la introducción de *Trichoderma* en los sustratos del vivero en condiciones de fertilización de rutina, lo que motivó la realización de este estudio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Definir condiciones nutricionales óptimas en plantines de *Eucalyptus* creciendo en sustrato colonizado con *Trichoderma* con el objetivo de obtener máxima calidad y control de *Botrytis* en el vivero.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Definir dosis y fuentes de nutrientes para el óptimo desarrollo de los plantines de *Eucalyptus grandis* creciendo en sustrato colonizado con *Trichoderma harzianum*.
- Cuantificar la colonización de *Trichoderma* en el sustrato en diferentes condiciones de nutrición de plantines de *Eucalyptus*.
- Determinar la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en plantines de *Eucalyptus* creciendo en sustrato colonizado con *Trichoderma* y bajo diferentes sistemas de fertilización.

3. REVISION BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUCCIÓN DE PLANTINES DE *Eucalyptus grandis* w. Hill ex Maiden

3.1.1 Introducción

El marco legal, sin duda, incidió en el aumento drástico que experimentó el área plantada al comienzo de su período de vigencia (fundamentalmente a causa de los subsidios y exoneración impositiva), lo cual trajo como consecuencia un aumento en la eficiencia de la producción de plantines con la incorporación de nuevas tecnologías, para así poder satisfacer la demanda que existía en ese momento.

La superficie plantada de *Eucalyptus grandis* hasta el año 2002, corresponde a un total de 147.003 has en todo el territorio nacional. En el Departamento de Rivera la superficie plantada con esta especie asciende a 36.229 has ⁽¹⁾.

Las tecnologías mas utilizadas en el país, consisten en la producción de plantines con semilla importada, siembra automática, envases de bandejas y la utilización de sustrato elaborado. El sistema de riego utilizado es automático, se llevan a cabo controles de temperatura, un intensivo control fitosanitario y un calendario exhaustivo de fertilizaciones. El ciclo de producción, con las tecnologías mencionadas, abarca cinco meses aproximadamente ⁽¹⁾.

¹ Datos aportados por Dirección Forestal. Superficie forestada bajo proyecto, período 1975-2001. actualización abril 2002.

3.1.2 Ciclo productivo

La responsabilidad del éxito de la plantación forestal radica, en primera instancia, en el vivero. La etapa de vivero, donde a partir de la semilla se produce el plantín, es clave ya que en ella se define la calidad y potencial de la futura plantación.

En el vivero Buena Unión (COLONVADE S.A.), donde se realizó el ensayo, el ciclo productivo de la especie en estudio dura en total 19 semanas, abarcando los meses desde abril hasta septiembre, a partir del cual los plantines son llevados a campo. (com. pers. Ing. Agr. Juan P. Posse)

El ciclo de producción se divide en dos etapas, la primera en la cual se da el crecimiento de los plantines y una segunda etapa donde el cultivo es llevado a condiciones más similares a las existentes en plantación, esta etapa es llamada normalmente etapa de rustificación. La primera etapa se lleva a cabo en invernáculo cerrado con una cubierta de polietileno, conjuntamente con sombrite, mientras que en la etapa de rustificación solamente están protegidas por una tela de media sombra. (com. pers. Ing. Agr. Juan P. Posse)

Dentro del ciclo de producción se realizan cuidados culturales y sanitarios, con el propósito de obtener una alta producción, junto a una buena calidad de plantín. Las tareas sanitarias que se efectúan en el vivero son tanto preventivas como curativas, basándose en productos químicos y aplicándose en forma intensiva a lo largo de todo el ciclo, las cuales serán ampliadas más adelante. Las tareas culturales son todas aquellas que favorecen la germinación, el desarrollo y la supervivencia de las plantas, como por ejemplo, riego, desmalezado, raleo, repique y fertilizaciones. (Irisity, 1999)

3.1.3 Calidad de planta

3.1.3.1 Concepto de calidad de planta

El concepto de “calidad” a nivel general, se define como: “un conjunto de cualidades de una persona o cosa”. Varios autores coinciden en que la planta de alta calidad es aquella que sobrevive a un estrés ambiental prolongado y produce un vigoroso crecimiento posterior en la plantación. (Cuevas 1995, citado por Coppola *et al.* 2000)

Por lo anteriormente expresado, el objetivo para la determinación de la calidad de las plantas, se basa en la sobrevivencia y en la reducción de los tratamientos culturales después de implantado el cultivo, debido a que se facilitará la competencia frente a las malezas y permitirá así superar la primera etapa más crítica, produciéndose como consecuencia una reducción en los costos a lo largo de la rotación. Otra razón por la cual se utilizan plantas de alta calidad, es que éstas presentan mayor tasa de crecimiento/ha/año, la cual resulta en un mayor volumen de madera, mayor uniformidad de las plantas y calidad de fuste. (De Araujo, 1995)

Cuando se menciona “calidad de planta”, se hace referencia a las siguientes características:

Equilibrio y Proporción: Una planta equilibrada, es aquella que mantiene una adecuada proporción entre su raíz y su parte aérea. Se dice que un plantín es proporcionado, cuando el diámetro del cuello se encuentra en equilibrio con la altura de éste.

Dimensión y edad: Las plantas jóvenes tienen un mayor crecimiento en las raíces y por lo tanto un mejor arraigamiento.

Densidad de hojas: Se trata de exigir una densidad de hojas que no sea escasa, ya que suministran nutrientes a las raíces, pero tampoco excesiva porque trae como consecuencia una mayor tasa de transpiración. Se recomienda que como mínimo presenten tres pares de hojas verdaderas.

Longitud y forma de la raíz: la longitud de la raíz debe de ser adecuada. Una corta longitud hace más susceptible a las plantas a condiciones de sequía y a las heladas, sin embargo una longitud excesiva dificulta y encarece la plantación.

Estado sanitario: Las plantas deben estar libres de enfermedades de distinta índole. Se debe prestar atención a las coloraciones anormales que puedan ser debidas a factores ambientales y/o a falta de nutrientes.

Homogeneidad: El total de las plantas debe ser homogéneo ya que de lo contrario se evidencia un mal manejo y una baja calidad de la semilla. (Coppola et al. 2000)

3.1.3.2 Parámetros que definen la calidad de planta

Los parámetros que determinan la calidad de planta son de dos tipos. El primero se basa en aspectos fenotípicos, denominados, parámetros morfológicos y el segundo son parámetros fisiológicos que se basan en fundamentos internos. (De Araujo, 1995)

Parámetros morfológicos

Los parámetros morfológicos pueden ser utilizados como un factor de predicción cualitativo para el futuro comportamiento de la planta en el campo, debido a que la morfología de ésta es un indicador del estado fisiológico. Son parámetros observables y fáciles de medir. (Coppola *et al.* 2000)

Schmidt y Vogt (1966), (citado por De Araujo, 1995) establecen la clasificación a partir de parámetros morfológicos que determinan la calidad de las plantas, como se detalla a continuación:

- ◆ altura de planta
- ◆ Atributos de vigor
 - Peso total del plantín
 - Peso total/H ⁽¹⁾ (cm)
 - Peso de parte aérea
 - Peso parte aérea/H
 - Diámetro del cuello
 - Diámetro del cuello/H
 - Parte aérea/parte radicular
- ◆ Capacidad de enraizamiento
 - Peso de raíz
 - Peso de raíz/altura
 - Superficie activa de la raíz
 - % de raíces
 - Presencia de micorrizas

¹ H: Altura en centímetros.

sobrevivencia a sitios secos. Según datos recabados por Coppola *et al.* (2000), el coeficiente más utilizado es de 7,5.

Relación parte aérea/raíz: Este coeficiente mide el balance entre el área que transpira y la superficie de absorción de la raíz. Por si sola no representa mucho valor, debido a que cambia con el tamaño de la planta y el tiempo. La relación más utilizada en el país, es de 2,5:1. (Coppola *et al.* 2000)

Arquitectura de la parte aérea: Es la forma en que se disponen en el tallo las ramas y el follaje en general, de acuerdo con el sistema radicular. Está fuertemente controlada genéticamente. Según datos recabados por Coppola *et al.* (2000), las características más deseables son; tallo recto, no bifurcado y no dañado y con respecto al número de hojas, ésta debe tener tres pares como mínimo.

Arquitectura de la raíz: Es la distribución y orientación espacial del sistema radicular. Esta ha sido una de las grandes cualidades que determina la calidad de la planta y las características que lo componen son; morfología, peso, volumen, longitud, fibrosidad, superficie y capacidad de absorción de agua. Datos obtenidos por Coppola *et al.* (2000), han demostrado que la raíz debe estar completa, con una exploración de todo el envase, raíz primaria pivotante, orientada verticalmente, raíces secundarias con orientación horizontal, presencia de pelos absorbentes y una buena concentración y gran cantidad.

Peso de los plantines: Es un parámetro poco usado por los viveristas, ya que requiere mayor cantidad de mano de obra. Dicho parámetro está influenciado por varios factores ambientales. Generalmente a mayor peso de la parte aérea, manteniendo una relación adecuada con el peso de la raíz, significa un mayor crecimiento después de la plantación. (Coppola *et al.* 2000)

Según Guerreiro y Colijunior, 1984 (citado por De Araujo, 1995) el criterio de clasificación para la selección de plantines de *Eucalyptus spp*, es el siguiente:

- ◆ Diámetro del cuello, mayor a 2 mm
- ◆ Altura entre 15 y 35 cm
- ◆ Alto grado de rustificación
- ◆ Sin problemas sanitarios
- ◆ Raíz pivotante normal
- ◆ Parte aérea sin bifurcaciones y con un mínimo de tres pares de hojas verdaderas
- ◆ Fuste sin tortuosidad acentuada.

Parámetros fisiológicos

Los parámetros fisiológicos se relacionan directamente con el futuro comportamiento de los plantines a campo, en el corto o largo plazo.

El agua es un factor importante que afecta a la fisiología de las plantas. El escaso riego causa deficiencias fisiológicas irreversibles en el cultivo, lo cual disminuye la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas en plantación. Se encontró correlación entre un buen régimen hídrico con algunos parámetros morfológicos, como ser diámetro del cuello, altura y relación altura/diámetro del cuello. (Anales del Simposio de Visçosa, 1983, citado por Coppola *et al.*2000)

Un adecuado balance de nutrientes es fundamental para la producción y el mantenimiento de las plantas de buena calidad. Una adecuada nutrición se

refleja en una mayor área fotosintética, lo que trae como consecuencia un aumento en los carbohidratos producidos, los cuales serán almacenados bajo la forma de almidón. Dichos carbohidratos serán utilizados para el mantenimiento de la planta luego del trasplante, debido a que éstas, no realizan fotosíntesis durante varias semanas o más tiempo, luego de ser llevadas al sitio definitivo. Con una adecuada fertilización las plantas adquieren otras ventajas fisiológicas, como el aumento a la resistencia a heladas. (Coppola *et al.* 2000)

Como se explico en el párrafo anterior, la nutrición es importante, pero una dosis excesiva de nutrientes empeora la calidad morfo-fisiológica de la planta. Por ejemplo, altas dosis de nitrógeno provocan un intensivo crecimiento de la parte aérea, con tejidos tiernos en detrimento del sistema radicular. (Fiedler *et al.* 1973, citado por Coppola *et al.* 2000)

3.2 NUTRICION DE PLANTINES

Para la obtención de plantines forestales de óptima calidad, con alto potencial de crecimiento en el vivero y un adecuado crecimiento inicial a campo, una de las tareas fundamentales que debe realizar el viverista, es una adecuada fertilización. Como en cualquier otro cultivo, por medio de los fertilizantes se provee un mayor y mejor suministro de nutrientes, que normalmente son limitantes para el crecimiento de las plantas. Esto se debe a que el sustrato utilizado normalmente en la producción comercial de plantines, no posee suficientes nutrientes para cubrir las necesidades de las mismas. (Palotti y Vola, 1994)

Los fertilizantes pueden ser utilizados por los viveros independientemente de la escala de los establecimientos, siendo una práctica rentable. Por tal motivo, es de vital importancia identificar los efectos de la aplicación de distintos nutrientes en el vivero de *Eucalyptus*, con el fin de establecer momentos y dosis óptima de fertilización en cada etapa. Las dosis y las fuentes a utilizar a nivel nacional son particulares para cada vivero, ya que no hay investigaciones científicas y por esta razón, éstas han sido obtenidas a partir de ensayo de pruebas y error por cada vivero. (con. pers. Ing. Agr. (MSc) Alicia Crosara)

A partir de las diferentes relaciones de macronutrientes necesarias en cada momento del ciclo de producción, se realiza el plan de fertilización. En el vivero Buena Unión, donde se realizó el ensayo, dicho plan se fracciona en tres subetapas, las cuales son denominadas: etapa de "arranque", "cría" y "terminación". A continuación se pasará a desarrollar las relaciones de macronutrientes utilizadas por el vivero mencionado, en cada una de las fases indicadas anteriormente.

Al comienzo del ciclo productivo, se realiza en primer lugar una fertilización al sustrato, luego fertilizaciones foliares a base de N,P,K, teniendo en cuenta una relación 2:3:2 (N:P:K) (com. pers. Ing. Agr. Juan P. Posse). La mayor proporción de fósforo incorporada en esta fase, se debe a que la mayor parte de éste se absorbe durante los primeros estadios de desarrollo. (Jones,1988), este nutriente cumple una función de relevancia en el metabolismo energético del vegetal, es requerido para la transferencia de energía dentro de las células, en la formación de esteres de fosfatos y fosfatos ricos en energía. Es un elemento estructural de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y fosfoproteínas. (Dell, 1996) Según Von Wernich *et al.* (s. f.) se recomienda que la primera etapa de desarrollo del cultivo, debe ser rica en

fósforo, para promover un buen desarrollo radicular. Esta relación de N:P:K se utilizó en la fase denominada “fase de arranque”, la que comprende aproximadamente 3 semanas.

En una segunda etapa, la fertilización se basa fundamentalmente en la incorporación de nitrógeno bajo dos formas, en la primera parte se agrega como amonio (NH_4^+) y luego en forma de nitrato (NO_3^-). La relación que se trata se mantener es 3:2:2 (N:P:K) (com. pers. Ing. Agr. Juan P. Posse), la mayor incorporación de nitrógeno, se debe a que en esta etapa se promueve el desarrollo en altura y foliar de los plantines. (Von Wernich *et al.* (s. f.)) El nitrógeno es un constituyente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, ATP, alcaloides y también como componente estructural de la pared celular. (Dell, 1996) Esta fase es llamada “fase de cría” y abarca aproximadamente seis semanas.

En la última etapa, la relación de macronutrientes utilizada difiere de las anteriores, en este caso se emplea una relación 2:3:5 (N:P:K). (com. pers. Ing. Agr. Juan P. Posse) El potasio no forma parte estructural de la planta, aún así, son requeridas grandes cantidades de este elemento para el crecimiento y desarrollo del cultivo, ya que tiene la función de estabilizador del pH y osmoregulador, es requerido para la síntesis de proteínas y carbohidratos. Actúa como activador de numerosas enzimas y se conoce su participación en la apertura y cierre de estomas. (Dell, 1996)

Adecuadas cantidades de potasio vuelve a las plantas más resistentes a condiciones adversas de humedad y sequía, función que esta asociada a una mayor retención de agua. (De Araujo, 1995) Este notable incremento de potasio busca el endurecimiento de la planta y hace que ésta se vea menos susceptible al estrés ocasionado en el transplante. (Rodríguez *et al.* 1993)

Este elemento también está asociado a los mecanismos de defensa que utiliza la planta para combatir las enfermedades. La incidencia y la severidad de los daños causados por los hongos patógenos, se reducen notablemente en plantas bien nutridas con potasio. Esto es debido a que se favorece la síntesis y la acumulación de compuestos fenólicos, además, estas plantas presentan un mayor espesor de la cutícula y de la pared celular, dado que hay una mayor formación de tejido esclerenquimatoso, de lignificación y de suberificación. (Von Wernich *et al.* (s. f.))

Cuando las plantas presentan deficiencias de potasio se favorece la formación y acumulación de compuestos de bajo peso molecular como ser: carbohidratos solubles, aminoácidos y nitrógeno soluble, estos compuestos alteran el equilibrio osmótico de la célula y los exudados liberados por las plantas, tiene mayor concentración de éstos, situación que favorece el desarrollo de enfermedades. (Von Wernich *et al.* (s. f.)) La fase descrita se denomina "fase de terminación".

Las dosis de fertilizantes aplicadas en todo el ciclo productivo, en el vivero donde se realizó el ensayo son de 0.03 g/planta para nitrógeno y fósforo y para el caso de el potasio, es de 0.036 g/planta. (com. pers. Ing. Agr. Juan P. Posse)

Otros autores coinciden con la información proporcionada por el vivero Buena Unión. Donald *et al.* (1992), sugieren que para obtener una buena producción de plantas, la relación 2:3:2 es la recomendada para plantines de *Eucalyptus grandis*, cuando la fertilización es a través de sistema de irrigación.

Según Dalla-Tea y Marcó (1996), las aplicaciones de nitrógeno generalmente se incorpora como urea o como sulfato de amonio,

aproximadamente 0,02 gr./planta. En experimentos con plantines de *Eucalyptus grandis*, se observó que la máxima respuesta en el crecimiento, se producía cuando, se daban aplicaciones de 0,03 gr. de nitrógeno y 0.03 gr. de fósforo/planta.

Wright (1987) cita que cuando se utiliza corteza de pino como sustrato, esta posee baja capacidad de retención de nutriente y por lo tanto es necesario realizarle un enriquecimiento de nutrientes previamente a la siembra y luego la utilización de fertilizantes foliares para poder corregir los problemas nutricionales. (Palotti y Vola, 1994)

La cantidad de nutrientes incorporados en la fertilización base de cada vivero, se determinan teniendo en cuenta los requerimientos de la planta. Una planta balanceada debe contener los siguientes rangos de nutrientes.

Cuadro N° 1: *Concentraciones foliares de nutrientes en plantines de Eucalyptus grandis, creciendo bajo invernáculo.*

Macronutriente	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	
Rango	1.25-5.30	0.075-0.275	0.75-1.75	0.55-0.95	0.25-0.40	
Micronutrientes	Fe (ppm)	Mn (ppm)	S (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	B (ppm)
Rango	150-190	80-120	2400-2900	12-16	25-32	55-239

Fuente: Judd et. al., 1996.

Cuadro N° 2: *Requerimientos de nutrientes para plantines de Eucalyptus spp.*

Nutrientes	Tenor bajo	Tenor medio	Tenor alto
N %	< 1.00	1.00-1.30	1.40-1.60
P %	< 0.07	0.07-0.09	0.10-0.12
K %	< 0.60	0.06-0.90	1.00-1.20
Ca %	< 0.40	0.40-0.70	0.80-1.20
Mg (ppm)	< 0.20	0.20-0.39	0.40-0.50
Cu (ppm)	< 4	4-7	8-10
Fe (ppm)	< 100	100-149	150-200
Mn (ppm)	< 50	50-99	100-600
Zn (ppm)	< 20	20-39	40-60

Fuente: ABC da análise de solos e folhas. A. Malavolta Editora Agronômica CERES Ltda. Sao Paulo, SP1992

3.3 SANIDAD DE PLANTINES

3.3.1 Problemática de *Botrytis cinerea* en viveros forestales

Botrytis cinerea, es el agente causal de la enfermedad llamada "moho gris de los Eucalyptus", el cual bajo condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, puede provocar serias pérdidas en viveros forestales, llegando a alcanzar pérdidas de hasta un 40-60% de la producción de plantines. (com. pers. Ing. Agr. Graciela Romero) Esta enfermedad aparece principalmente en forma de tizones, pero también como cánceres o pudriciones del tallo, ahogamiento de las plántulas y manchas foliares. (Agris, 1995)

El control de esta enfermedad en los viveros, resulta difícil, ya que el patógeno puede atacar cultivos en cualquier estadio de crecimiento y en cualquier parte de la planta, puede afectar tallos, hojas, pecíolos, etc. *Botrytis cinerea*, puede comportarse como parásito o saprofito. Actualmente, a nivel nacional, el control de esta enfermedad, esta basado en el uso de fungicidas. (Reyna, 2000) Éstos, provocan en el patógeno, un desarrollo de la resistencia, lo que lo hace un control, menos efectivo. (Elad and Evensen, 1995)

3.3.1.1 Descripción

El hongo imperfecto, *Botrytis cinerea* Pers: Fr., pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Moniliales, Familia Moliaceae, (Orecchia *et al.* 1992)

La forma perfecta pertenece a la clase Ascomycete, orden Helotiales, especie *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetrel, (Syn.: *Sclerotinia fuckeliana*) (Orecchia *et al.* 1992; Bovey, 1984)

La fase asexual consiste en hifas vegetativas, esclerocios y conidias. Los conidióforos son más o menos rectos con una longitud de 2 mm o más, ramificados, a menudo con un pedúnculo y una cabeza de ramificaciones bastante abiertas. Son lisos, de color claro, marrones en la base y más pálidos cerca del ápice. Las ramas terminales producen conidios lisos, unicelulares, obovales o elipsoidales, de color entre hialino y pardo claro, que en la masa de conidios resulta pardo grisáceo, y con medidas promedio de 10 x 7,5 μm aunque con grandes variaciones.⁽¹⁾ La organización de las esporas en forma de

¹ Botrytis en invernadero. www.terraia.com/revista22/pagina72asp

racimos da el nombre a este género: en griego botrys significa grupos de uvas. Los esclerocios producidos por este hongo en sustrato natural y en medios de cultivo suelen ser negros y muy variables en cuanto a tamaño (normalmente al menos de 3 mm de diámetro) ⁽¹⁾

La fase sexual consiste en un cuerpo reproductivo, apotecio, que contiene ascosporas en ascas lineales. Los tallos de los apotecios llegan a 3 cm de longitud y a 1-2 mm de grosor; los discos son cóncavos, pardo amarillentos y de hasta 8 mm de diámetro. Las ascas son cilíndricas, las ascosporas elipsoidales o fusiformes, de 9-15 x 4-7 μm , y uninucleadas. ⁽¹⁾

No se ha encontrado información en cuanto a la presencia de la fase sexual en nuestro país, desarrollándose ésta en condiciones ambientales desfavorables. Las condiciones climáticas que se dan en Uruguay permiten un rápido y efectivo desarrollo de la enfermedad.

3.3.1.2 Desarrollo de la enfermedad

Fuentes de inóculo primario

Las fuentes primarias de inóculo la constituirían los micelios que quedan en los restos vegetales, en el interior y en el exterior de los invernaderos, y que se han mostrado viables por un largo período de tiempo, ya que se ha demostrado la poca importancia de los esclerocios como fuente de inóculo. ⁽¹⁾ En viveros forestales, *Botrytis* puede sobrevivir en sustratos orgánicos en proceso de descomposición, hojas muertas, caídas, en la superficies de los

¹ Botrytis en invernadero. www.terraia.com/revista22/pagina72asp

recipientes y tejidos de plantines de *Eucalyptus* como componentes de la flora del filoplano. (Sanfuentes *et al.* 1997)

Diseminación

Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de éstas. En viveros de *Eucalyptus*, la forma más común de dispersarse el inóculo, es a través de los conidios y los restos vegetales que son diseminados por el viento; el salpicado del agua de riego sobre el material infectado, ya sea el depositado sobre la superficie de la bandeja o sobre las copas de las plántulas; y las gotas de condensación que se forman en el plástico del invernáculo. ⁽¹⁾

Germinación o Infección

La temperatura óptima para la infección depende en parte de las reacciones de defensa del hospedero. (Jarvis, 1989) La infección generalmente requiere un clima húmedo y moderadamente frío (18° a 23° C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule en mayor grado, libere y germinen sus esporas, y para que produzca una infección más severa. (Agrios, 1995) Según O'Neill *et al.* (1997), la infección ocurre entre los 5° y los 26° C y es máxima a los 15°C.

Los conidios son liberados por medio de mecanismos higroscópicos, bajo condiciones de rápidos cambios de humedad. *Botrytis cinerea* es dependiente

¹ Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel. www.laural.es/servagro/fitosanitario/enfermedades/botrytis

de una película de agua para la germinación de las esporas y para la infección. (Jarvis, 1989)

La infección del follaje, se produce generalmente después de que el hongo se ha desarrollado sobre los órganos moribundos, material en descomposición, el cual se encuentra en la superficie de la bandeja o a través del contacto que se pueda producir entre las hojas infectadas y las sanas. (Agrios, 1995)

Penetración

Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero lo hacen en tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre el follaje moribundo de las plantas. ⁽¹⁾ Los tallos pueden ser infectados directamente por heridas o a través del pecíolo. (O'Neill *et al.* 1997)

Antes de que el patógeno penetre el tejido vegetal, el hongo desarrolla un tubo germinativo, el cual se fija al huésped por medio de una estructura llamada apresorio. (Reyna, 2000) Es necesario que se encuentren disponibles en la superficie de la planta fuentes exógenas de nutrientes para la germinación y elongación del tubo germinativo antes de entrar al hospedero. (Zimand *et al.* 1996)

¹ Técnicas para el control de Botrytis. www.infoagro.com/abonos/botrytis

La penetración se da a través de un proceso mecánico y enzimático. En el proceso enzimático se secretan algunas enzimas como ser cutinasas y esterases, las cuales ayudan a brindarle plasticidad a la pared del patógeno y también a la disolución de la cutícula y pared celular del huésped. (Mc Eden, 1973)

Según Zimand *et al.* (1996), *Botrytis* produce enzimas pécticas e hidrolasas, siendo las primeras las degradadoras de pectinas, actuando en la desorganización de la estructura de la pared celular del hospedero.

Síntomas y signo

Los principales síntomas que desarrolla esta enfermedad son el ahogamiento de las plántulas de *Eucalyptus*. Inicialmente se da un enrollamiento de las hojas en las que se observa el micelio gris del hongo tomando posteriormente el tallo. ⁽¹⁾ Cuando la infección llega a éstos, aparecen lesiones pardas, desarrollándose en los tallos suculentos, mostrándose como lesiones hendidas, alargadas, de color oscuro, con un contorno bien definido o bien pueden extenderse sobre el tallo y hacer que éste se debilite o quiebre a nivel de la zona de infección, provocando el colapso de la planta y su muerte. (Agris, 1995)

Bajo condiciones húmedas, el hongo produce una capa fructífera conspicua de moho gris sobre los tejidos afectados, característica que le proporciona el nombre a la enfermedad. Bajo estas condiciones el hongo libera fácilmente sus conidios. (Agris, 1995)

¹ *Botrytis* en invernadero www.terraia.com/revista22/pagina72asp

3.3.1.3 Condiciones predisponentes para el desarrollo del patógeno

Botrytis cinerea es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, abarca desde los 4° a los 32°C, siendo el crecimiento muy lento en los extremos. La temperatura óptima para el crecimiento del hongo ronda los 21° a 25°C, mostrándose más activo, por debajo de los 21°C que por encima de los 25°C, es particularmente problemático bajo condiciones de temperatura moderada y alta humedad. ⁽¹⁾

La humedad generalmente es un factor más limitante que la temperatura, debido a que se necesita aproximadamente 70% para la esporulación, y agua libre para la germinación de las esporas del patógeno. ⁽¹⁾ La temperatura y humedad relativa tienen influencia en la enfermedad de forma separada o conjunta, en general son óptimas humedades relativas del 95%. ⁽²⁾

La enfermedad es más severa durante los años con prolongadas lluvias y largos períodos nublados, ésta puede desarrollarse a temperaturas menores que el óptimo, siempre y cuando el follaje permanezca húmedo por largos períodos de tiempo. (Ellis, (s. f.)) Sosa et al. 1995 citado por O'Neill et al. (1997), encontraron que el total de horas de humedad y la duración de esta humedad en el individuo, reflejó un mayor efecto en la cantidad de inóculo producido por *Botrytis*, cuando las temperaturas fueron óptimas para su desarrollo.

¹ The Problem: Botrytis (gray mold) www.ipmofalaska.com

² Botryotinia fuckeliana (de Bary) Whetzel. www.laural.es/servagro/fitosanitario/enfermedades/botrytis

3.3.2 Manejo sanitario del vivero

Actualmente las medidas utilizadas para el control de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en viveros forestales, es el uso de productos químicos y prácticas culturales. Sin embargo el control por medio de estas prácticas se ve restringida por razones económicas y ecológicas. (Fernández-Larrea, 2001)

Las prácticas culturales, son realizadas para prevenir y reducir el inóculo del patógeno. Una de las prácticas más utilizadas y fundamental para prevenir la infección, es el reconocimiento y la posterior eliminación de las fuentes de inóculo tanto del exterior del invernadero como en los alrededores, incluyendo semilla contaminada o infectada, plantas afectadas (Jarvis, 1989), hojas senescentes de la base de las plantas y/o caídas en la superficie del sustrato. (Sanfuentes *et al.* 1997) Esta medida es esencial, debido a que *Botrytis cinerea* precisa bases nutritivas, proporcionadas por las hojas senescentes, etc., es decir materia orgánica muerta, para poder iniciar la invasión hacia las partes vivas de la planta. (Agris, 1995)

Uno de los aspectos a tener en cuenta para el control de esta enfermedad, debería ser, condicionar las dimensiones y tipo de invernadero, como ser la aplicación de cubiertas plásticas, con absorción de luz ultravioleta ya que reducen la esporulación y la tasa de colonización del patógeno. ⁽¹⁾ Además, tener en cuenta la aireación, calefacción y el riego en invernáculo con el fin de reducir la duración de los períodos diarios que combinan humedad a saturación, condensaciones y temperaturas, para prevenir la humedad del canopy. (O'Neill *et al.* 1997) (Jarvis, 1989)

¹ Técnicas para el control de Botrytis www.infoagro.com/abonos/botrytis

Una técnica muy difundida en los viveros forestales, es la fertilización nitrogenada. La excesiva aplicación de nitrógeno puede producir un tierno y denso follaje, lo cual trae como consecuencia, un sombreado que no permite que se ventile rápidamente el cultivo, durante períodos húmedos, creándose así condiciones ideales para el desarrollo de la enfermedad. (Ellis, (s. f.)) Por tal motivo hay que evitar las fertilizaciones con altas dosis de nitrógeno.

En el Uruguay, el control de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* se realiza por medio de fungicidas químicos (con. pers. Ing. Agro. Graciela Romero), éste puede ser insatisfactorio basado en que los fungicidas pueden llevar al desarrollo de la resistencia a los compuestos comúnmente usados. (Williamson and Mc Nicol, 1986). Como ejemplo se puede citar que *Botrytis* fue el primero en la historia en crear resistencia al fungicida Benomyl. (Romero, 1995) Por esta razón, los viveristas utilizan más de un compuesto, en forma preventiva y curativa, aplicándolos en aspersiones foliares de manera alternada.

Los fungicidas más utilizados para el control de *Botrytis cinerea* son: Captán; Benomyl, de nombre comercial Benlate; Clorotalonil, de nombre comercial Bravo; Iprodione, de nombre comercial Rovral; Triofanato de metilo, de nombre comercial Topsin; Venclozonil, de nombre comercial Ronilan. (Agrios, 1995; Romero, 1995) Las dosis y los momentos de aplicación, dependen de la rutina de cada vivero, por lo general se aplican semanalmente.

Las posibilidades de sustituir o disminuir el uso de productos químicos en el control de enfermedades producidas por hongos, a través de técnicas alternativas como el control biológico, están siendo investigadas desde las últimas décadas por varios investigadores. Se han realizado numerosos estudios que prueban la influencia de antagonistas de diversas especies de hongos saprófitos entre ellos, *Trichoderma spp.* (Fernández-Larrea, 2001; Eden

et al. 1996) El control químico ha brindado buenos resultados en el control de algunas estructuras del patógeno, pero no de sus cuerpos de resistencia, condicionando los momentos de aplicación. Los fungicidas biológicos tienen como ventaja, que pueden ser usados para controlar aquellos patógenos que desarrollan resistencia a los químicos.

3.3.3 Agentes de control biológico como herramienta del control integrado de *Botrytis cinerea* en viveros de *Eucalyptus*.

3.3.3.1 Generalidades del Control Biológico

Baker and Cook (1974) definen el Control Biológico como la reducción de la densidad del inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, por uno o más organismos, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedero o antagonista, o por la introducción de una población de uno o más antagonistas. Arcia (1995), señala que esta definición refleja que el manejo integral de poblaciones es más que una acción específica dirigida a un solo patógeno, como podría ser en el uso de productos químicos.

La gran cantidad de métodos que se utilizan en el control biológico se puede dividir en forma general en dos grupos: los *directos*, en que los antagonistas se pueden introducir directamente sobre o dentro del tejido de la planta; e *indirectos*, en que las condiciones del cultivo, suelo o ambiente, se pueden modificar de manera de promover la actividad de los antagonistas que ocurren naturalmente (Baker and Cook, 1974).

El método *directo*, comprende la introducción masiva de microorganismos antagónicos en el suelo, con o sin una base alimenticia, para inactivar los propágulos del agente patógeno; reduciendo su número y suprimiendo la infección. Los antagonistas actúan de varias maneras incluyendo: una rápida colonización de la rizósfera adelantándose al agente patógeno, competencia que excluye al organismo nocivo, produciendo antibióticos, originando sustancias que provocan lisis del patógeno o por micoparasitismo. Algunos autores sugieren, que organismos no parasíticos de la rizósfera limitan las epidemias al "inducir" resistencia o al sensibilizar el tejido de la planta, para reaccionar rápido con sus mecanismos de defensa cuando ataca el patógeno. (Baker y Cook, 1974)

El control biológico de los patógenos del suelo, aprovecha directa e indirectamente la competencia de un organismo contra otro, o crea un medio ambiente adverso al patógeno, en el suelo, sin necesidad de emplear funguicidas. Esta basado en la reducción de la actividad del patógeno por medio de otro organismo, este efecto puede ser biocida, un organismo mata a otro, o biostático, un organismo inhibe a otro. (National Academy of Sciences. 1978)

Para lograr el éxito del control biológico se requiere manejar varios factores: el sistema de cosecha, la epidemiología del patógeno a ser controlado, la biología, ecología y dinámica de la población del agente de biocontrol y las interacciones entre estas variables (Lo *et al.* 1997; Boff, 2001).

El agente de control biológico más estudiado y evaluado para el control de hongos fitopatógenos, corresponde a especies de *Trichoderma spp*, debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en muchos sustratos, control de amplio rango de patógenos, acción como micoparásito y

alta competencia por alimento y espacio. (Wells, 1988 citado por Villegas y Castaño (s. f.))

En numerosas investigaciones se observó que *Trichoderma harzianum*, solo o en combinación con otros antagonistas o ya sea aplicado de forma alternada con determinados fungicidas, fue un efectivo biocontrolador de *Botrytis* de algunos cultivos hortícola bajo invernáculo. (Eden *et al.* 1996; Elad *et al.* 1993; Boff, 2001)

3.3.3.2 *Trichoderma spp.*

Trichoderma spp no ha sido asociada a la etapa asexual, por lo que produce únicamente esporas asexuales en forma mitótica y clonal. La taxonomía tradicional está basada principalmente en el aparato de esporulación asexual. (Kubicek and Harman, 1998)

El organismo crece y se ramifica rápidamente, alcanzando colonias de 7-9 cm de diámetro, luego de tres días, desarrollando típicas hifas hialinas de 2 a 7 μm de diámetro. La esporulación asexual ocurre en los conidióforos que se forman en las puntas de las hifas los cuales tienden a ser verticilados, formando una estructura piramidal de 8 μm en la base, 2.5 a 4.5 μm en el ápice. (Bissett, 1991)

Los conidios son unicelulares, de forma subglobosa a obovoide o cortamente elipsoidales, de 1.7 a 3.2 x 1.3 a 2.5 μm (Bissett, 1991), liberados en grandes cantidades, dando una apariencia granular, tornándose rápidamente de un color amarillo verdoso a un verde oscuro. (Kubicek and Harman, 1998)

El hongo forma estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, intercalares o terminales en cortas ramificaciones, las cuales son unicelulares, pero pueden fusionarse entre dos o más; de forma sobglobosa a elipsoidal o periforme, de coloración subhialinas a amarillentas, de 4 a 12 μm de diámetro, con una pared de 1 μm de espesor (Bissett, 1991). Estas estructuras son de mayor tamaño que los conidios por sus grandes reservas de lípidos. (Cohen, 1983) Por su naturaleza, representan la forma de propagación más efectiva debido a que ésta posee mayor sobrevivencia en el suelo que los conidios y pueden permanecer viables en él, hasta por lo menos 20 meses. (Lewis and Papavizas, 1984)

Ecología

Trichoderma es una especie que crece en todas las regiones climáticas y en una gran variedad de suelos, como ser, praderas, suelos agrícolas, forestales, salinos y desérticos. Existe una correlación entre la distribución de las especies y las condiciones ambientales, como por ejemplo *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii* se encuentran bajo condiciones de excesiva humedad, *Trichoderma viride* y *Trichoderma polysporum* habitan en regiones de temperaturas frías, *Trichoderma harzianum* es característico de temperaturas cálidas, mientras que *Trichoderma koningii* y *Trichoderma hamatum* están ampliamente distribuidas. (Danielson and Davey, 1973c; Kubicek and Harman, 1998)

Son caracterizados como saprófitos, degradando la materia orgánica, con excepción de aquellos que atacan a otros hongos. Pueden constituir más del 3% del total de los propágulos de hongos en un amplio rango de suelos forestales y un 1.5% en pasturas. Bajo condiciones naturales son invasores

secundarios. Generalmente se encuentran localizados en las primeras capas de descomposición debido a que es un hongo celulolítico, dominando en las capas F ⁽¹⁾ y H ⁽²⁾ y en cortezas duras de árboles forestales. Las especies de *Trichoderma* parecen ser más comunes en los suelos ácidos, habitualmente son intolerantes a bajos niveles de humedad, siendo éste uno de los factores que contribuye al bajo número de *Trichoderma* en las capas superficiales de los suelos forestales. (Kubicek and Harman, 1998)

A pesar de ser un habitante natural del suelo, Lo *et al.* (1997), sugieren que *Trichoderma harzianum* tiene la capacidad de sobrevivir en el filoplano, durante dos semanas, en plantas de tomate; dichos autores, indican que la capacidad de sobrevivir es una característica deseable de las cepas utilizadas en el biocontrol de enfermedades foliares.

Lo *et al.* (1998), compararon las poblaciones de *Trichoderma* del suelo y las del follaje. Es importante resaltar que la cantidad de inóculo para ambos ambientes fue similar, más aún las poblaciones del suelo disminuyeron de 6 a 5 unidades formadoras de colonia (UFC)/g suelo, en la última semana de evaluación, mientras que las poblaciones del follaje se mantuvieron en 6 UFC/50 g de follaje, lo que podría reflejar que en el ambiente aéreo el *Trichoderma* tiene mayor capacidad de ocupar el nicho que el follaje le ofrece. Sin embargo, Andrews (1992), indica que el éxito del biocontrol en la filósfera es más desafiante que en la rizósfera, señalando que el éxito del biocontrol en la filósfera está en lograr determinar los factores que afectan la capacidad de colonización y dominancia competitiva en la comunidad foliar.

¹ Capa intermedia del piso forestal, constituida por materiales orgánicos fragmentados, parcialmente descompuestos

² Capa inferior del piso forestal, constituida por materia orgánica descompuesta

3.3.3.3 Mecanismos que actúan en el antagonismo

Las plantas disponen de varias vías y mecanismos para resistir el ataque de diversos patógenos. Aunque algunas veces el patógeno supera la propia defensa del vegetal produciendo una infección muy difícil de combatir, es posible aumentar las defensas de la planta frente a dichos agentes patógenos.

El uso de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol es mayoritariamente preventivo, ya que si todavía no ha habido ataque, la planta está preparada y protegida para impedir la infección fúngica, y si ésta se ha producido ya, la acción del hongo *Trichoderma* proporciona a la planta una ayuda fundamental para superar dicha infección, llegando en algunos casos a controlarla. (Campbell, 1989)

A parte de su facilidad para colonizar las raíces de las plantas, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Recientemente, han sido demostrados varios mecanismos por los cuales actúa *Trichoderma spp.* como biocontrolador y como colonizador de las raíces.

Los que actúan directamente sobre el hospedero (patógeno) son: *micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, y desactivación de las enzimas de los patógenos*. Por otro lado los mecanismos que intervienen sobre la planta y que indirectamente afectan el desarrollo del patógeno son: *tolerancia al estrés por parte de la planta, al ayudar al desarrollo del sistema radicular; solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y resistencia inducida*. (Harman, (s. f.a)) Estos últimos serán desarrollados más adelante.

En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica a seleccionar en un antagonista. El mecanismo de acción va a estar relacionado con la especie del patógeno que esté involucrado en dicho proceso.

Micoparasitismo:

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. (Vero y Mondino, 1999) El micoparasitismo o hiperparasitismo, se refiere al caso en que un hongo es parasitado por otro hongo. (Campbell, 1989)

El micoparasitismo se considera como un atributo de todas las especies de *Trichoderma spp.* y el mejor mecanismo de control biológico de distintas enfermedades fúngicas, provocadas por patógenos del suelo. Este micoparásito actúa sobre estructuras inactivas, como ser, esclerocios o hifas en crecimiento. (Campbell, 1989)

La degradación y la posterior asimilación de los hongos fitopatógenos, llamada micoparasitismo, es un complejo proceso que abarca varios pasos. Inicialmente, el micoparásito crece junto al hospedero y generalmente se enrolla en forma de espiral sobre él, o se adhiere por medio de la formación de estructuras parecidas a los apresorios. (Elad *et al.* 1983, citado por De la Cruz *et al.* 1995) A continuación, penetra el micelio del hospedero, aparentemente, por la degradación parcial de la pared celular. Finalmente, se asume que

Trichoderma spp., utiliza el contenido intracelular del hospedero. (Elad *et al.* 1984, citado por De la Cruz *et al.* 1995)

La pared celular de la mayoría de los hongos, está formada principalmente, por quitina y β -1,3-glucano, por lo tanto se espera que para el éxito de la degradación de la pared celular intervengan más de una enzima. (Bartnicki y Garcia, 1968, citado por De la Cruz *et al.* 1995) *Trichoderma spp.* ataca al patógeno, por medio de la secreción de enzimas extracelulares que producen lisis, tales como β -1,3-glucanasas, proteasas y quitinasas, las cuales actúan en la degradación de la pared celular de las hifas, conidios o esclerotos. (Melgarejo 1989, Ulhoa 1996, citados por Vero y Mondino, 1999) (Fernández-Larrea, 2001; Haran *et al.* 1996) y posteriormente reduciendo la incidencia de la enfermedad. (Brants and Earle, (s. f.))

Lorito *et al.* 1993, reportaron actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* por enzimas quitinolíticas, producidas por *Trichoderma harzianum*. (Zimand *et al.* 1996)

De la cruz *et al.* (1995), identificaron y caracterizaron dos β -1,6-glucanasas, las cuales intervienen en la actividad micoparasítica por parte de *Trichoderma harzianum*. En dicho informe se reporto una efectiva inhibición de *Botrytis cinerea*, por parte de las enzimas mencionadas.

Antibiosis:

Se refiere a la producción de sustancias por parte de un microorganismo, las cuales son tóxicas para otros microorganismos. Actúan en bajas

concentraciones (menores a 10 ppm.). Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que existe el riesgo de que aparezcan cepas del patógeno, resistentes al antibiótico. (Vero y Mondino, 1999)

Durante mucho tiempo, se ha sugerido que los antibióticos están involucrados en el biocontrol por parte de *Trichoderma spp.* Svasithamparam y Ghisalberti (1998), nombraron 43 sustancias con actividad antibiótica producidas por *Trichoderma spp.* (Harman, 2000) La actividad antibiótica durante el proceso de biocontrol depende fundamentalmente del tipo de cepa que este actuando, por ejemplo, *Trichoderma virens* produce el antibiótico llamado gliotoxin, mientras que no existe evidencia de que *Trichoderma harzianum* produzca algún antibiótico (Papavizas, 1985), aunque otros estudios realizados por Morrell (1990) demostraron la inhibición de la pudrición de madera, a través de la producción de antibióticos volátiles. (Kubicek and Harman, 1998) Según Tronsmo y Dennis (1977), encontraron que *Trichoderma* controla *Botrytis* en frutilla, a través de un parasitismo directo y por la producción de antibióticos. (Elad *et al.* 1994; Pezet *et al.* 1999)

El mecanismo de antibiosis es fácil de evidenciar *in vitro*, pero es difícil de detectar en la naturaleza. No pudiéndose detectar que las sustancias antibióticas sean producidas en el suelo en cantidades suficientes, cómo para realizar un control biológico tangible. (Papavizas, 1985)

Competencia:

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización

del mismo por uno de los organismos, reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. (Vero y Mondino, 1999) El mecanismo de "competencia" que poseen algunas cepas de *Trichoderma* se considera esencial para la prevención de enfermedades, pues la zona colonizada no podrá ser ocupada por ningún patógeno.

Botrytis cinerea es vulnerable por competencia de nutrientes por parte del agente de biocontrol, ya que es un hongo típicamente dependiente de éstos. Sus esporas requieren de nutrientes exógenos, como ser azúcares libres, carbohidratos no estructurales y aminoácidos para que se produzca la germinación de las esporas, elongación del tubo germinativo y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al hospedero. (Campbell, 1989; Zimand *et al.* 1996)

Según Elad *et al.* (1999), citado por Harman, 2000, *Trichoderma harzianum* es un efectivo biocontrolador de *Botrytis cinerea* mediante la competencia por nutrientes. (Zimand *et al.* 1996; Sanfuentes *et al.* 1997)

Trichoderma ha sido encontrado penetrando y viviendo dentro de la corteza de la raíz de las plantas. (Inbar *et al.* 1994) En un estudio realizado por Betucci *et al.* (1997), *Trichoderma harzianum* se encontró presente dentro de las hojas de las plántulas de *Eucalyptus globulus*. A partir de estos datos se pudo deducir que la competencia por espacio puede ser un mecanismo posible para el biocontrol de *Botrytis cinerea* y patógenos del suelo.

Desactivación de las enzimas del patógeno:

La desactivación de las enzimas del patógeno, se ha planteado como un nuevo mecanismo potencial para el control biológico. El antagonista *Trichoderma harzianum* produce enzimas llamadas proteasas, las cuales degradan las enzimas degradadoras de la pared celular de la planta producidas por *Botrytis cinerea*. Las enzimas involucradas en la degradación de la pared son enzimas pectinolíticas extracelulares que involucran hidrolasas y liasas. Las hidrolasas son poligalacturonasa y pectina metil estereasas, las enzimas liasas como ser la pectate liasa. (Elad, 2000)

En un estudio realizado para el control de *Botrytis cinerea* sobre hojas de frijol, la producción y también la actividad de las enzimas antes mencionadas por parte del patógeno se vieron disminuidas. En el caso de la producción de la poligalacturonasa, disminuyó entre un 40-83%, mientras que la pectina metil estereasas y la pectate liasa, disminuyeron un 100% y un 30% respectivamente. En dicho trabajo se sugiere que el efecto mencionado puede deberse por la combinación de dos efectos. En primer lugar el efecto directo de *Trichoderma harzianum* cepa T39 sobre la actividad de las enzimas del patógeno. El efecto indirecto que puede estar causando la reducción de la enfermedad es la activación de los mecanismos de defensa de la planta. (Zimand, 1996) Cervone *et al* 1989 citado por Zimand, 1996, sugieren que es la acumulación de las enzimas pépticas, como por ejemplo oligogalacturoides, las que actúan como desencadenante de los mecanismos de defensa de la planta.

3.3.3.4 Factores determinantes para el desarrollo de *Trichoderma*

Un buen desarrollo del agente de biocontrol esta condicionado por factores *nutricionales* y *no nutricionales*. Dentro de la última clasificación se encuentra los factores físicos y químicos como ser temperatura, humedad, pH, concentración de sales, concentración de CO₂, HCO₃, materia orgánica y la presencia de otros microorganismos en el suelo. (Papavizas, 1985) A continuación se pasarán a detallar algunos de ellos.

Requerimientos de temperatura:

El género *Trichoderma* presenta una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, Danielson y Davey (1973b), aislaron 16 cepas de diferentes especies, las cuales presentaron un rango de temperaturas máximas entre 28° a 42 °C, con un rango de temperaturas óptimas de 22° a 34 °C. Una de las cepas aisladas de *Trichoderma harzianum*, registró un buen crecimiento aún a los 7 °C, tolerando una temperatura máxima para su desarrollo de 32 °C y mostrando una temperatura óptima de 27 °C. En general, la mayoría de las cepas aisladas presentaron un rango de temperaturas máximas que pueden tolerar entre 30° a 38 °C. Knudsen y Bin, (1990) señalaron que la temperatura óptima para *T. harzianum* fue 20°C. En otras investigaciones se detectó que el hongo presenta un crecimiento lento a temperaturas por debajo de 15 °C. (Björkman, (s. f.))

Humedad:

El género *Trichoderma*, difiere en cuanto a su afinidad por los contenidos de humedad, encontrándose algunas especies adaptadas a condiciones de excesiva humedad como es el caso de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii* o aquellas que necesitan niveles de humedad moderados en el suelo para un buen desarrollo. (Danielson y Davey 1973c) Se han observado que algunas poblaciones de *Trichoderma* disminuyen cuando en el suelo se mantienen condiciones de sequía por largos periodos de tiempo (Papavizas, 1985). Por lo general, el crecimiento en el suelo se vio favorecido cuando no había situaciones extremas de excesos de humedad o cuando el suelo estaba demasiado seco. ⁽¹⁾

PH:

La actividad de *Trichoderma spp* es favorecida en condiciones ácidas. (Ahmad and Baker, 1987). Según Kubicek and Harman (1998), el crecimiento óptimo, se encuentra generalmente, entre un pH 4 y 6.5, y solo unas pocas especies parecen tolerar un pH menor a 3. En otras investigaciones, se observó que el mejor crecimiento del antagonista, en medio de cultivo, fue a un pH 5.5 con reducciones en el desarrollo por debajo de 4.1, pero con crecimientos a pH tan extremos como 3.5 y 10. Según otros autores, Danielson and Davey (1973b), *Trichoderma harzianum*, presenta un rango de óptimo crecimiento, a pH de 3.7 a 4.7.

¹ Evaluación de algunos de los parámetros que afectan el crecimiento y colonización de *Trichoderma spp*.
www.presidencia.gov.co/ica/publicaciones/epidemiologia/bole13/boletin13.htm

Concentración de CO_2 , HCO_3^- y de sales:

Trichoderma spp. es un microorganismo aerobio obligado, aunque se han aislados cepas a partir de hábitat con muy bajas concentraciones de oxígeno. Por tal motivo, la tolerancia a las concentraciones de dióxido de carbono, depende específicamente de cada cepa, sin embargo otros autores sugieren que cepas de *Trichoderma spp.* resisten concentración de dióxido de carbono mayores que otros hongos. Según Schinner and Durand citado por Kubicek and Harman (1998) han reportado que pueden tener la propiedad de fijar el carbono a partir del CO_2 .

El crecimiento de *Trichoderma*, es afectado por las condiciones alcalinas del medio y éstas son modificadas por las concentraciones de HCO_3^- . A medida que aumenta la concentración de bicarbonato, disminuye el crecimiento. Esta reducción se piensa que puede deberse ya sea a un efecto directo como indirecto. El efecto indirecto es a través de cambios en el pH provocados por la adición del HCO_3^- , siendo el pH un factor limitante para el crecimiento de *Trichoderma*. El efecto directo estaría dado por la toxicidad del bicarbonato debido a una acumulación de éste en la zona de la raíz. (Riley and Barber, 1969, citado por Danielson and Davey, 1973b). El bicarbonato es particularmente responsable de la composición de la población microbiana en la rizósfera debido a que los microorganismos presentan diferentes grados de tolerancia a las concentraciones de este compuesto. (Danielson and Davey, 1973b)

En cuanto al efecto que puedan tener las sales sobre el crecimiento de *Trichoderma spp.*, se puede decir que está altamente condicionada a la especie y/o cepa que se encuentre presente. Danielson and Davey (1973b), encontraron que *T. psatumisporum*, *T. polysporum* y un aislado de *T. hamatum*, fueron

fuertemente inhibidas con un 5% de cloruro de sodio. Mientras que *T. harzianum*, *T. viride* y un aislado de *T. koningii*, no se vieron afectadas por la concentración de esta sal. Sin embargo, sales como las de magnesio aumentan el crecimiento de *T. viride*. (Papavizas, 1985)

3.3.3.5 Necesidades nutricionales

El aspecto más importante en la nutrición de los organismos heterótrofos es la forma de utilización del carbono y el nitrógeno. Como se ha mencionado anteriormente, *Trichoderma* es un hongo saprófito, el cual utiliza una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno requiriendo un nivel mínimo de carbono orgánico del 1 % para garantizar su proliferación en el cultivo. ⁽¹⁾

Los requerimientos de carbono y energía de *Trichoderma spp.* pueden ser satisfechos por monosacáridos, disacáridos y complejos de polisacáridos, como por ejemplo, dextrosa, fructosa, manosa, galactosa, xylosa, ribosa y celobiosa; sin embargo la capacidad de usar la sucrosa, melitosa y rafinosa esta relacionada a las unidades taxonómicas. Todos los aislamientos probados descomponen rápidamente la celulosa (Danielson y Davey, 1973a). Como fuente de carbono también son utilizadas las purinas, pirimidinas, aminoácidos, taninos, ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena larga y metanol. (Papavizas, 1985)

Como fuentes de nitrógeno inorgánico, *Trichoderma spp.* utiliza amonio, urea, nitrato y nitrito. El desarrollo sobre NH_4^+ fue considerablemente superior al desarrollo sobre NO_3^- ; en tanto que algunos aislamientos de *T. hamatum* y *T.*

¹ Trichoderma the flagship for mycofungicides. www.nutri-tech.com.au

koningii fueron incapaces de usar NO_3^- . El amonio parece ser la fuente más rápida y fácilmente utilizable por *Trichoderma spp.* (Danielson and Davey, 1973a). La mejor fuente de nitrógeno orgánico son los aminoácidos, como por ejemplo, L-alanina, L-aspartico, ácido L-glutámico y ácido casamino. (Kubicek and Harman, 1998)

Otros nutrientes requeridos para el crecimiento de *Trichoderma*, son fósforo, azufre, hierro y calcio. La mayoría de las especies son capaces de usar fosfato inorgánico y sulfato como fuentes de fósforo y azufre. El contenido de hierro es un factor determinante de los sitios de preferencia por *Trichoderma*, debido a que es requerido para su crecimiento. (Kubicek and Harman, 1998) En un estudio realizado por Björkman *et al.* (s. f.), se observó que en suelos que presentaban bajos niveles de calcio, la colonización se vio afectada, esto se debe a que el calcio influye en el crecimiento vegetativo al igual que en la esporulación. Otros iones metálicos son también importantes para el crecimiento de los hongos, pero en muy bajas concentraciones, sin embargo cuando se presentan en altas concentraciones, el crecimiento se ve disminuido. (Kubicek and Harman, 1998)

La cantidad de nutrientes influye en la densidad del micelio, pero no en el crecimiento (Knudsen and Bin, 1990). Larenas y Montealegre (1995), observaron que la densidad del micelio, proveniente de pellets de algiñato, con un contenido de 95 % de harina de trigo, fue notoriamente mayor, que en pellets con sólo un 3 % de harina, pero el largo del micelio para ambos pellets fue el mismo. Knudsen y Bin (1990), determinaron que el crecimiento del micelio es independiente de la cantidad de alimento y directamente proporcional a su densidad.

3.3.3.6 Efecto sobre el hospedero

Durante muchos años ha sido conocida la habilidad de estos hongos para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial de su sistema radicular, haciendo que los cultivos sean más tolerantes a situaciones de estrés como ser, resistencia a la sequía. Otros efectos que desencadena en la planta es la inducción de resistencia, la cual se menciona por varios autores, como un mecanismo indirecto para el control de enfermedades. Como consecuencia de la presencia del agente de biocontrol, la planta puede utilizar nutrientes no disponibles por medio de la solubilización de estos. (Harman, (s. f.a))

Incremento en el crecimiento

Trichoderma spp. es un hongo que se puede encontrar tanto fuera como dentro de la rizósfera (Chao et al, 1986; Danielson and Davey, 1973c), ya que es en ésta donde puede colonizar y proteger las raíces de las plantas (Chao et al. 1986). Pero ésta no es la única ventaja que las plantas superiores reciben de *Trichoderma spp.* Varios autores han señalado el incremento en peso de las plántulas que se desarrollan en presencia de este hongo. Por ejemplo, incrementos en la tasa de emergencia en plantas de tomate; el aumento en peso seco de las plantas de tomate y tabaco (Windham et al. 1986); aumento del peso, cantidad de flores y altura de plantas de crisantemos (Chang et al. 1986) aumento del área foliar, diámetro del cuello y altura de plantas de pepino y pimiento (Inbar et al. 1994); en el aumento del crecimiento del sistema radicular de plantas mejoradas de maíz dulce (Björkman et al. 1998) y mayor homogeneidad de las plantas de acelga y tomate (Mónaco, 1990).

Muchos mecanismos han sido sugeridos para explicar estos fenómenos mencionados en el párrafo anterior, los cuales incluyen un efecto indirecto asociado con la reducción de los patógenos menores de la rizósfera (Rabeendran *et al.* 2000) y el efecto directo se debería tanto a la producción de “metabolitos secundarios”, como ser hormonas y vitaminas, y por la conversión de nutrientes no disponibles por la planta a una forma utilizable, incrementando la absorción y la translocación de éstos.(Mónaco, 1990; Inbar *et al.* 1994) Mónaco, 1990, descarta la hipótesis de que el aumento del crecimiento se deba a la reducción de patógenos de la rizósfera según un estudio realizado con sustrato esterilizado.

Solubilización de nutrientes

Altomare *et al.* (1996), sugieren que la promoción del desarrollo se debe a que *Trichoderma spp.* tiene la capacidad de solubilizar el manganeso sin importar el pH del medio ni la disponibilidad del mismo. Estos autores señalan que este microelemento es requerido para varias funciones fisiológicas de las plantas, tales como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno, especialmente la reducción del nitrato, y la síntesis de los compuestos aromáticos como precursores de aminoácidos y hormonas (auxinas), de fenoles y de lignina; resaltando, que el manganeso juega un papel importante en el crecimiento y la resistencia a enfermedades de las plantas. Este micronutriente puede estar presente en más de un estado de oxidación, sin embargo la forma en que se encuentra disponible para la planta, es como Mn^{+2} , mientras que el Mn^{+4} es insoluble.

Según Altomare *et al.* (1999), *Trichoderma harzianum* cepa T22 tiene la habilidad de solubilizar el magnesio, fósforo, hierro (Fe^{+3}), manganeso (Mn^{+4}),

zinc y cobre (Cu^{+2}), siendo estos escasamente solubles o insolubles. Particularmente en el caso del hierro el agente de biocontrol tiene la capacidad de reducir y quelatar el Fe^{+3} , sin embargo en el caso del manganeso solo puede producir formas reducidas.

Como conclusión, podemos decir que, la solubilización de los metales por *Trichoderma spp.*, involucra tanto la quelatación como la reducción. Ambos mecanismos son también conocidos como actuantes en el biocontrol de patógenos de plantas y puede ser parte de la acción de múltiples componentes ejercidos por T22, para poder conseguir un efectivo biocontrol bajo una variedad de condiciones ambientales. (Altomare *et al.* 1999)

Esta actividad puede explicar, por lo menos parcialmente, la habilidad de la cepa T22 para aumentar el crecimiento de la planta, lo cual no significa que aumenten los contenidos de los nutrientes dentro de la planta por una mayor absorción de éstos. En un estudio realizado por Inbar *et al.* (1994), no se encontraron diferencias significativas en los contenidos N, P, K entre las plantas de pimiento tratadas con *Trichoderma harzianum* con respecto al control. En el mismo artículo se presentaron datos no publicados que demuestran lo contrario.

Desarrollo del sistema radicular

La habilidad de *Trichoderma harzianum* de incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, incluye especialmente el aumento del sistema radicular, con la producción de un mayor número, grosor y profundidad de las raíces. Como consecuencia de esto los cultivos son más resistente a la sequía. (Harman, (s. f.b))

Un buen desarrollo de las raíces es necesario para el establecimiento del hongo, el cual puede estar limitado por el estrés o enfermedad. Cuando el agente de biocontrol esta actuando, el crecimiento de la raíz se ve estimulado. En experimentos en invernáculos el peso seco de la raíz de los plantines inoculados con *Trichoderma harzianum* luego de 21 días de plantados fue mayor que las plantas control, presentando valores de 500 mg y 320 mg respectivamente. La exploración de las raíces fue muy superior en los plantines inoculados (70%) que el control (31%). (Björkman *et al.* 1995)

Lo *et al.* (1997), hacen referencia a que *Trichoderma spp.* incrementa la absorción de nutrientes a través del mejoramiento del desarrollo radicular o promoviendo la disponibilidad de los nutrientes necesarios. Corroborando estos resultados, otro estudio indica que las raíces de las plantas de maíz colonizadas por *Trichoderma harzianum* cepa T22 requieren menos fertilizantes nitrogenados con relación a aquellas que no se encuentran colonizadas. (Harman, (s. f. a))

Resistencia inducida

Diferentes cepas de *Trichoderma spp.* pueden controlar a cada hongo patógeno para el cual se ha diseñado un programa de biocontrol. Sin embargo, la mayoría de cepas de *Trichoderma spp.* son más eficientes para controlar ciertos patógenos, pudiendo ser ineficaces contra algunos otros hongos. Se ha descubierto recientemente que algunas cepas pueden inducir a las plantas para que "enciendan" su mecanismo nativo de defensa, esto hace pensar que se podrían controlar a otros patógenos a parte de los hongos del suelo. (Harman, (s. f. a))

La resistencia inducida es reconocida como un importante mecanismo de biocontrol en tejidos vegetales. El sistema de inducción de resistencia, causado por varios microorganismos antagonistas, puede proteger a las plantas contra patógenos del suelo o foliares, como es el caso de *Botrytis cinerea*. (Elad, 2000)

La inducción a la resistencia a patógenos puede ser demostrado por dos maneras; por la aplicación del agente de biocontrol en una localización separada del órgano de la planta infectada, o por aplicación de células muertas del agente en el mismo lugar de la infección. (Elad, 2000; Harman, 2000)

Según un estudio realizado por Elad (2000), se observó que con aplicación de células vivas o muertas de *Trichoderma harzianum* cepa T39 en las raíces de plantas de pepino, se obtuvo un buen control de los hongos mildius en el canopy para los dos casos, sin embargo para *Botrytis cinerea* fue controlada sólo parcialmente por medio de células muertas en comparación con las células vivas.

De Meyer *et al.* (1998), estudiaron el control de *Botrytis cinerea* por medio de *Trichoderma harzianum* cepa T39. El ensayo consistió en la inoculación de ambos hongos en forma separada en tiempo y espacio, para poder comprobar si el mecanismo actuante en el biocontrol era el sistema de resistencia inducida.

Se observó que cuando T39 fue aplicada antes de la infección producida por el patógeno, la severidad de la enfermedad fue menor, se cree que el mecanismo por el cual se da el biocontrol es el sistema de resistencia inducida; sin embargo cuando el agente de biocontrol fue aplicado junto con el patógeno, se entiende que además del mecanismo mencionado actuarían otros.

El desarrollo de la infección fue considerablemente reducido cuando el agente de biocontrol fue incorporado sobre partes de plantas, especialmente separadas del sitio de inoculación del patógeno. Cuando *Trichoderma harzianum* fue aplicada al suelo, redujo la infección de tallos por *Botrytis cinerea*, en pimiento y también disminuyó la infección en hojas en tomate, lentejas, pimiento, tabaco y frijol. La severidad de la enfermedad fue menor cuando el agente de biocontrol fue aplicado con más de un día de anterioridad con respecto al patógeno, debido a que se necesita más de un día para que se desencadene el sistema de inducción de resistencia.

Se observó que el establecimiento de las lesiones de *Botrytis cinerea* se expande mas lentamente cuando se incorpora el agente de biocontrol en la hojas en comparación a la aplicación al suelo. Según los autores, esto indica claramente, que la resistencia inducida no es el único modo de acción involucrado, como por ejemplo competencia por nutrientes y supresión de las enzimas del patógeno. (De Meyer *et al.* 1998)

Tal vez la cualidad más importante atribuible a *Trichoderma spp.*, es la capacidad de estas especies de inmunizar y proteger a la planta hospedera, en una relación simbiótica similar a la que existe entre las bacterias fijadoras de nitrógeno en raíces de leguminosas o entre hongos micorríticos y el sistema radicular de muchas especies vegetales. *Trichoderma spp.* puede sobrevivir considerables períodos de tiempo dentro del hospedero no causando daños, pero sí ofreciéndole muchos años de protección contra una variedad de microorganismos. ⁽¹⁾

¹ Trichoderma the flagship for mycofungicides. www.nutri-tech.com.au

3.3.3.7 Formas de inclusión de *Trichoderma* en el Sistema Sustrato-Plantín.

Para introducir antagonistas al medio, las consideraciones de importancia a tener en cuenta para una buena efectividad biológica de los productos comerciales a base de *Trichoderma spp.* Son: la pureza del aislamiento, la cepa; la concentración del inóculo, las clases de coadyuvantes usados, el envasado y almacenaje, la eficacia y el tiempo de aplicación; condiciones de microclima durante y después de la aplicación y el costo de producto. (Suton and Peng, 1993)

Según el tipo de patógeno actuante y la enfermedad que éste produzca, se recomiendan diferentes modos de aplicación de los productos formulados a base de *Trichoderma harzianum*. Las formas de aplicación recomendadas por varios autores son: tratamientos a la semilla, al suelo y foliar. (Harman, 1996)

Los productos comerciales formulados a partir de *Trichoderma harzianum*, son efectivos como tratamientos de semilla, aún si éstos son aplicados con o sin la adición de funguicidas. Los químicos proveen buena protección a la semilla a corto plazo (unas pocas semanas), mientras que los antagonistas le dan protección a largo plazo durante toda la estación de crecimiento. Como consecuencia, los rendimientos son incrementados en comparación al uso de químicos solamente. (Harman, 1996) Cuando son aplicadas a la semilla, algunas formulaciones pueden persistir hasta 18 meses luego de la aplicación. Sin embargo la mayoría de las cepas, pierden esta habilidad. (Harman, (s. f. b))

Pueden ser usados también, como aditivos en las mezclas de sustratos usados en cultivos de invernáculo. Puede reducir el uso de pesticidas por limitar

las enfermedades que atacan a la raíz y proteger a la planta en el transplante a campo debido a su habilidad por colonizar la raíz. (Harman, 1996)

Cuando es agregado al césped, con formulaciones granulares, resulta en un establecimiento de los organismos sobre la raíz y en un posterior control de los patógenos del suelo. Sin embargo, los patógenos pueden sobrevivir en un número suficiente como para causar la enfermedad. Una vez que los patógenos se estabilizaron en el follaje, la aplicación del agente de biocontrol al suelo, no puede protegerlo por mucho tiempo. Esta formulación, puede resultar, por lo tanto, en una disminución de la enfermedad, pero debe ser usada en combinación con fungicidas químicos compatibles. (Harman, 1996)

El control biológico sobre la superficie de las plantas está mucho menos desarrollado que en el suelo y rizoplano por dos principales razones: la primera es debida a que los antagonistas pueden mantenerse por ellos mismos más fácilmente en el suelo porque es un medio ambiente más propicio y en segundo lugar, porque la disponibilidad de fungicidas químicos y su fácil aplicación al follaje, ha atrasado el uso del control biológico en superficies aéreas (Papavizas, 1985).

Para el caso de pudriciones de frutos causados por *Botrytis cinerea*, se recomiendan aplicaciones foliares. Para un máximo control de *Botrytis* en pudrición de racimo en uva, la aplicación inicial necesita ser complementada por una última aplicación en el momento de madurez del fruto, con la adición de un fungicida químico compatible con el agente de biocontrol como Iprodione. La aplicación en conjunto del antagonista y el fungicida parecen tener actividad sinérgica comparado con su efecto por separado. (Harman, 1996)

No siempre los compuestos formulados con *Trichoderma harzianum*, son compatibles con la mayoría de los fungicidas químicos, por lo tanto como norma general, no deben aplicarse los fungicidas químicos dos semanas antes a la aplicación de *Trichoderma*. Según la bibliografía consultada, los fungicidas biológicos mencionados, no son compatibles con los fungicidas químicos Captán (Björkman, (s. f.)), el cual posee como principio activo, N-tricloromrtiltio-4-ciclohexeno-1,2,dicarboximida (Modernel, 1998), ni con los benzimidazoles. (de nombre comercial Benomyl y Topsin). (Chang *et al.* 1986)

Comportamiento de *Trichoderma* en el sustrato

Trichoderma spp. generalmente se encuentra presente naturalmente en los sustratos utilizados por los viveros forestales, ya que éstos son preparados a base de corteza de pino compostada. Cuando es agregado al sustrato, *Trichoderma harzianum* presenta un buen crecimiento, siendo aún mayor la colonización en sustratos previamente esterilizados, esto podría ser adjudicado a la ausencia de competencia (Kubicek and Harman, 1998) y a la mayor disponibilidad de nichos.

En un estudio no publicado, se observó que el número de colonias varía a lo largo del ciclo productivo de los plantines de *Eucalyptus grandis*, partiendo de una cantidad inicial de 1×10^6 UFC/ gr. de sustrato y finalizando el ciclo productivo, con 3.3×10^5 UFC/ gr. de sustrato. (con. pers. Bch. Diego Cárdenas) Lo que haría suponer, la necesidad de complementar con aplicaciones foliares para poder mantener niveles aceptables que permitan la expresión del antagonismo en todo el ciclo productivo del plantín y así cubrir la protección contra *Botrytis cinerea*. (con. pers. Ing. Agr. Amalia Baraibar)

No existen antecedentes nacionales y es muy escasa la literatura internacional, sobre la inclusión de *Trichoderma* en sustratos en viveros de *Eucalyptus*, así como las aplicaciones foliares posteriores, para mantener los niveles adecuados de protección. Por tal motivo no hay bibliografía que oriente en forma consistente las propuestas experimentales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el vivero Buena Unión propiedad de la empresa COLONVADE S.A., ubicado en el Km. 456 de la ruta nacional N° 5, paraje Buena Unión, departamento de Rivera.

4.1 MATERIALES

Los materiales utilizados en este trabajo fueron:

Sustrato: Compuesto por: 30% de Cocosoil (importado de Argentina por Poul Forestal, de origen brasilero), 60% de corteza Argentina (el origen es de PROA S.A. Establecimiento Cerro Verde de la localidad Gobernador Virasoro, provincia de Corrientes), 10% de corteza de pino de FYMNSA (compostada por COLONVADE S.A.)

Bandejas: Bandejas de PVC conteniendo 72 celdas cada bandeja, de 93 cc cada una y sistema antiespiralizante. Este sistema consiste en un diseño con bordes verticales en el interior, creando un obstáculo y no dejando que la raíz

crezca en espiral, obligándola a crecer en dirección al orificio de drenaje, en el cual se produce una poda natural de las raíces por la exposición al aire.

Semillas: La semilla utilizada fue *Eucalyptus grandis* de origen sudafricana, Mondi Forest. Según el análisis realizado en el Laboratorio Análisis de Semilla, se pudo comprobar que el porcentaje de germinación fue del 98%.

Trichosoil: El fungicida biológico, de nombre TRICHOSOIL, está compuesto por el agente de biocontrol *Trichoderma harzianum* cepa L1 (mínimo 5×10^8 ufc/gr de producto) en un 58.8% y el restante 41.2% por sustancias inertes. Elaborado en LAGE & CIA S.A. Esta cepa fue seleccionada por activo antagonismo contra *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia*, *Botrytis cinerea* y es compatible con el fungicida ROVRAL. (Reyna, 2000)

Fertilizante: Los fertilizantes utilizados fueron los siguientes; Magnun (18-44-00), Nitrato de potasio (13-00-46), Triple 18 (18-18-18+Te), Nitrato de amonio (34-00-00), Nitrato de calcio (15.5-00-00+Ca), Fercicare (11-09-35) y Fosfato de potasio (00-52-34).

Productos químicos: Para la desinfección del sustrato, se utilizó Bromuro de metilo. Como fungicida para controlar *Botrytis*, se aplicó ROVRAL.

Otros materiales: Las fertilizaciones se realizaron con una regadera. En la medición de los parámetros morfológicos se utilizó un cartabón o calibre, una regla milimetrada y balanza de precisión.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Descripción del ensayo

El ensayo consistió en la producción de plantines de *Eucalyptus grandis*, bajo invernáculo, en condiciones controladas de humedad y temperatura. Se llevó a cabo durante los meses de mayo a octubre, siendo ésta una práctica habitual en el vivero para su plantación en primavera.

Se realizaron 5 tratamientos con 4 repeticiones por tratamiento. La diferencia entre tratamientos corresponde a las diferentes dosis de fertilizante utilizadas. (Ver cuadro N°3). Del total de los tratamientos, dos son testigos y mantienen la misma fertilización pero difieren en la presencia del agente de biocontrol. El tratamiento 1 es el único que no posee *Trichoderma harzianum* mezclado en el sustrato.

El calendario de fertilizaciones se divide en tres etapas según el procedimiento que se realiza en el vivero: la fase de arranque, la de cría y la de terminación. Para la primera fase se utilizaron los siguientes fertilizantes: Magnun (18-44-00) y Nitrato de potasio (13-00-46). En la fase de cría se aplicó Triple 18 (18-18-18+Te), Nitrato de amonio (34-00-00) Nitrato de potasio (13-00-46) y Nitrato de calcio (15.5-00-00+Ca). Por último en la fase de terminación se utilizó Ferticare (11-09-35) y Fosfato de potasio (00-52-34) (Ver cuadro N°3). Estas fertilizaciones fueron determinadas según el objetivo de una producción comercial, la cual es obtener una planta vigorosa, con buenos niveles nutricionales al momento del trasplante a campo.

A continuación se muestra el cuadro N° 3 con los diferentes tratamientos con sus respectivas fertilizaciones.

Cuadro N°3: Dosis de fertilizaciones por tratamiento

Etapa	Fertilizante	Tratamiento 1* (gr./pl)	Tratamiento 2** (gr./pl)	Tratamiento 3** (gr./pl)	Tratamiento 4** (gr./pl)	Tratamiento 5** (gr./pl)
Arranque	18-44-00	0.010	0.010	0.020	0.010	0.020
	13-0-46	0.006	0.006	0.012	0.012	0.006
Cría	18-18-18	0.015	0.015	0.030	0.015	0.03
	34-0-0	0.004	0.004	0.008	0.008	0.004
	18-18-18	0.015	0.015	0.030	0.015	0.03
	13-0-46	0.0035	0.0035	0.007	0.007	0.0035
	15.5-0-0+Ca	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035	0.0035
Terminación	11-9-35	0.013	0.013	0.026	0.013	0.026
	0-52-34	0.009	0.009	0.018	0.018	0.009

* T1 sin *Trichoderma harzianum*

** T2, T3, T4 y T5, con *Trichoderma harzianum*

Cuadro N° 4: Cantidades agregadas de macronutrientes según tratamiento en las diferentes etapas del cultivo.

Etapa	Etapa de arranque + cría			Etapa de arranque + cría + terminación		
	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Nitrógeno	Fósforo	Potasio
Tratamiento 1* (gr./pl)	0.01033	0.010	0.00816	0.01176	0.01585	0.01577
Tratamiento 2** (gr./pl)	0.01033	0.010	0.00816	0.01176	0.01585	0.01577
Tratamiento 3** (gr./pl)	0.02013	0.020	0.01954	0.02300	0.03170	0.03476
Tratamiento 4** (gr./pl)	0.01293	0.010	0.01414	0.01430	0.02053	0.02481
Tratamiento 5** (gr./pl)	0.01753	0.020	0.01517	0.02039	0.02702	0.02733

* T1 sin *Trichoderma harzianum*

** T2, T3, T4 y T5, con *Trichoderma harzianum*

4.2.1.1 Sustrato

Para la obtención del sustrato, se mezcló, 30% de cocosoil, 60% de corteza Argentina, 10% de corteza de pino de FYMNSA y por último se le adicionó 4 Kg. de superfosfato simple por metro cúbico de sustrato. El mismo fue esterilizado con Bromuro de metilo, dejándolo tapado durante 24 horas. Posteriormente y por una semana permaneció destapado, previo a la incorporación del agente de biocontrol. Finalmente se mezcló el sustrato con el fungicida biológico, a razón de 2.0 Kg de fungicida por m³ de sustrato. La mezcla se humectó y se mantuvo cubierta, incubando por dos días para promover la germinación de los conidios y el desarrollo de más micelio.

4.2.1.2 Siembra

La siembra se realizó el 15/05/02, en forma mecanizada, utilizándose semilla proporcionada por la Empresa. Luego de colocada las semillas se cubrieron con vermiculita y por último se realizó un riego ligero. Se sembraron un total de 80 bandejas.

4.2.1.3 Fertilización

La misma se realizó vía foliar en el agua de riego cuando los plantines tenían siete semanas de edad (28/06/02). La fase de arranque consistió en un total de tres semanas y con una frecuencia de una fertilización por semana, culminando esta etapa el día 19/07/02. La segunda etapa se lleva a cabo a lo largo de 8 semanas, finalizando el 16/09/02. La fertilización en este caso se realizó cada diez días. La razón del cambio de frecuencias de fertilización se

debió a un exceso de agua en los plantines, el cual iba en detrimento de la sanidad. La etapa de terminación consistió en dos fertilizaciones, culminando el día 9/10/02.

Para todas las etapas se efectuaron mediciones de conductividad en las diferentes soluciones tratando de que ésta no superara los 2200 $\mu\text{s}/\text{cm}$, con el objetivo de controlar las sales de cada aplicación.

Como consecuencia de un alto ataque de *Botrytis cinerea*, se prosiguió a la aplicación del fungicida de nombre comercial ROVRAL, en una dosis de 200 g/100 l de agua, aplicado el 27/8/02. Previendo una disminución en la población del agente de biocontrol por la aplicación del producto mencionado, se reincorporó *Trichoderma harzianum* en forma de suspensión, aplicado vía foliar, a razón de 10 cc/m^2 . La pulverización se llevó a cabo el día 4/09/02.

4.2.2 Medidas realizadas

En el presente ensayo se efectuaron dos muestreos, el primero se realizó el 4/09/02 y el segundo y último el día 23/10/02. La elección de las bandejas a ser muestreadas fue al azar.

4.2.2.1 Medidas realizadas en la planta

Los parámetros evaluados para determinar la calidad de planta fueron: diámetro a la altura del cuello, altura de la parte aérea, peso seco aéreo y peso seco radicular.

La determinación de los parámetros morfológicos se realizó con un cartabón o calibre y la altura de la parte aérea, se efectuó con una regla milimetrada. Las medidas fueron efectuadas en dos momentos para lo cual se dejó permanente una única bandeja por repetición y por tratamiento, obteniéndose de esta forma un seguimiento del comportamiento de las plantas.

La parte aérea fue separada de la radicular para la determinación del peso seco y análisis foliar (macro y micronutrientes). Los plantines fueron lavados y pesados, posteriormente se secaron a microondas (Cazzolino, 1997) hasta peso constante.

A partir de la observación y del conteo de los individuos que presentaban sintomatología de ataque de *Botrytis cinerea*, se evaluó la incidencia de la enfermedad provocada por el patógeno. El conteo se llevó a cabo en cada momento en el cual se realizaron las fertilizaciones, a partir del momento en que se visualizó el primer síntoma de la enfermedad. Los momentos de muestreo se corresponden con las fechas 26/07, 09/08, 19/08, 04/09, 16/09, 27/09 y 09/10.

4.2.2.2 Medidas realizadas en el sustrato

Para el sustrato se realizaron las mismas determinaciones que para análisis foliar, además de la relación carbono/nitrógeno, pH y conductividad.

Los análisis mencionados se efectuaron en tres momentos: antes de la siembra, en la fecha correspondiente al primer muestreo (4/09/02) y en la finalización del ciclo productivo (23/10/02).

En el laboratorio LAGE & CIA S.A., se realizó el conteo del número de colonias de *Trichoderma harzianum*, en el sustrato de cada bandeja. Para lograr la determinación de las colonias, se prosiguió de la siguiente manera; en primer instancia se pesaron 10 gr. de sustrato de cada repetición por tratamiento. A partir de estos 10 gr. de sustrato se efectuaron varias diluciones (10^2 , 10^3 , 10^4). De las diferentes diluciones se sembró 0.5 ml por placa de petri, previamente esterilizada, en un medio de cultivo constituido por: 10 gr. de sacarosa, 1.5 gr. de extracto de levadura, 0.1 gr. cloruro de sodio, 0.2 gr. de sulfato magnesio, 0.5 gr. de fosfato dipotásico, 10 gr. de agar y 10 ml de colorante rojo congo. Todos los valores son por litro de medio de cultivo. Antes de colocar la solución en las placas de petri, se le agregaron 200 ppm de sulfato de estreptomicina. Se ajustó a un pH de 5-5.3. Se colocaron las placas de petri en estufa a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. durante tres días, realizándose dos conteo en dicho período (segundo y tercer día). El peso seco de las muestras se obtuvo por medio del secado a estufa a 105°C durante tres horas. Para el análisis estadístico los datos de nivel de *Trichoderma* se transformaron a logaritmo.

4.3. DISEÑO ESTADÍSTICO DEL ENSAYO

El diseño estadístico fue de parcelas al azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. La mínima unidad experimental es la bandeja (parcela), la cual posee una capacidad para 72 plantines.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en el ensayo fueron sometidos al análisis de varianza y prueba de comparación múltiple, para poder detectar diferencias

entre los tratamientos. Para esto se utilizó el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC 27511)

La probabilidad de error utilizada varía según la variable analizada, debido a que el programa es el que determina dicha probabilidad.

5. RESULTADOS

La metodología utilizada para la evaluación de los resultados, consistió en un análisis de varianza y una posterior prueba de comparación múltiple (diferencia mínima significativa), para cada una de las variables estudiadas. El nivel de confianza utilizado para el análisis de varianza, varía según la variable utilizada ya que esta implícito en el propio programa (S.A.S.).

Para el análisis se utilizaron los datos del primer muestreo (4/09/2002), correspondiendo a la semana decimoséptima de desarrollo del cultivo y del segundo muestreo (23/10/2002), siendo la vigésimosegunda semana del cultivo.

Se detallaran a continuación las referencias que se utilizaron en todos los cuadros del presente capítulo.

T = Tratamiento

D.M.S. = Diferencia mínima significativa

a, b, c = Valor con diferencias significativas al 5% entre tratamientos.

5.1 RESULTADOS DE LAS MEDIDAS REALIZADAS EN LA PLANTA

5.1.1 Parámetros morfológicos

5.1.1.1 Altura

La altura de planta, es uno de los parámetros morfológicos que definen la calidad del plantín. Los resultados del análisis estadístico de los dos muestreos efectuados se presentan en el anexo 1, conjuntamente con toda la información recogida de las medidas efectuadas en los muestreos.

En el estudio del análisis de varianza para el primer muestreo, se observó un efecto diferente entre los tratamientos, con una confianza de 96%, en cambio no se observó ningún efecto entre tratamientos en el segundo muestreo, con un 80% de confianza, lo cual se presenta en el cuadro N° 5.

Cuadro N° 5: *Datos promedio de la altura de los plantines de Eucalyptus grandis en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Altura (cm)	Altura (cm)
T1	17.000 b	51.800 b
T2	19.150 ab	54.250 ab
T3	20.925 a	55.250 ab
T4	19.600 a	54.975 ab
T5	18.875 ab	56.075 a

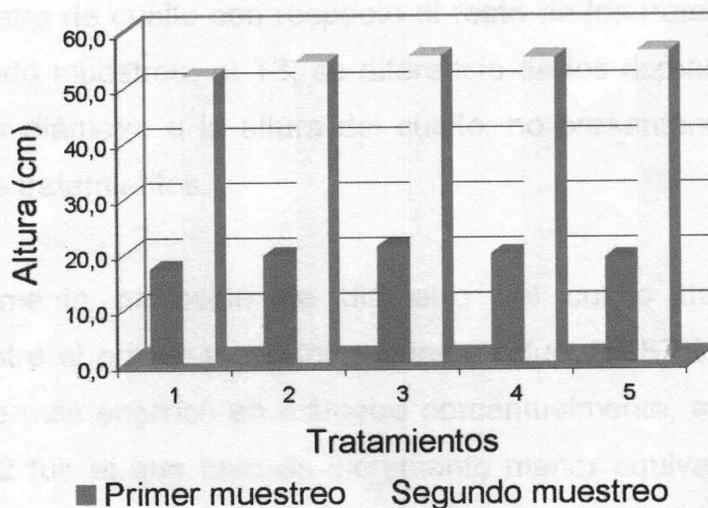
*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Al realizarse la prueba de D.M.S para el primer muestreo, se percibieron diferencias entre los T3 y T4 con respecto al T1, mientras que los T2 y T5 son intermedios. El T3 fue el que presentó mayor altura y el T1 mostró menor altura de planta, esto último se mantuvo en el segundo muestreo, mientras que en este caso el T5 fue el que presento mayor altura y T2, T3 y T4 fueron intermedios.

Aunque no se registran diferencias significativas entre los T1 y T2, éste último mantuvo una altura superior a lo largo del ciclo productivo, siendo esta superioridad más marcada en el primer muestreo que en el segundo, presentando una variación del 11% y 4.5% respectivamente, diferenciándose ambos tratamientos por la presencia de *Trichoderma* (T2).

Se observó que entre el primer y segundo muestreo, el incremento promedio de altura entre los tratamientos fue del 186%, el menor incremento se obtuvo en T1 y T3. (Ver gráfica 1)

Gráfica N° 1: *Altura de los plantines según el momento de muestro.*



5.1.1.2. Diámetro a la altura del cuello

El análisis de varianza demostró para los dos muestreos, que existe por lo menos un tratamiento que difiere de los demás, esto se asume con una confianza del 98%, para el primer muestreo y del 92% para el caso del segundo muestreo. (Ver anexo 1)

Cuadro N° 6: *Datos promedio del diámetro a la altura del cuello en plantines de Eucalyptus grandis, en el primer y segundo muestreo*

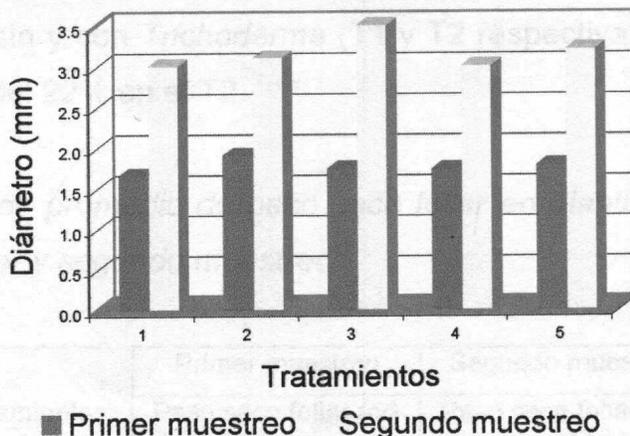
Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Diámetro (mm)	Diámetro (mm)
T1	1.675 b	3.000 b
T2	1.925 a	3.075 b
T3	1.725 b	3.450 a
T4	1.275 b	3.000 b
T5	1.775 b	3.150 ab

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Como se puede apreciar en el cuadro N° 6, el T2 fue significativamente mayor en diámetro de cuello con respecto al resto de los tratamientos. Para el caso del segundo muestreo, el T3, se diferenció de los demás, siendo éste el que tuvo mayor diámetro a la altura del cuello, no presentándose diferencias entre los demás tratamientos.

El incremento promedio de diámetro del cuello de los diferentes tratamientos entre el primer y segundo muestreo fue del 87%, siendo el T3 el tratamiento que más engrosó en diámetro porcentualmente, aproximadamente un 100%. El T2 fue el que tuvo un incremento menor equivalente a un 60%. (Ver gráfica N°2)

Gráfica N° 2: Diámetro a la altura del cuello en el primer y segundo muestreo



5.1.1.3 Peso seco de parte aérea

En el anexo 1 se muestran los datos recogidos en los muestreos de los plantines, así como también los resultados de los análisis estadísticos.

El análisis de varianza para la variable mencionada, demostró que no hay efecto entre los tratamientos en ninguno de los momentos de evaluación con un 70% de confianza en el primer muestreo y 79% para el segundo. Lo mismo se pudo comprobar en la pruebas de comparación múltiple, donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

En el primer muestreo se observó que entre los tratamientos con menores dosis de fertilizantes, como es el caso de los T1 y T2, en comparación con el T3, (aplicación doble en la dosis de fertilizante), se percibió un aumento del peso seco de parte aérea del T2 (11%) con respecto al T3. En el segundo muestreo existió un cambio entre los tratamientos que obtuvieron mayor valor

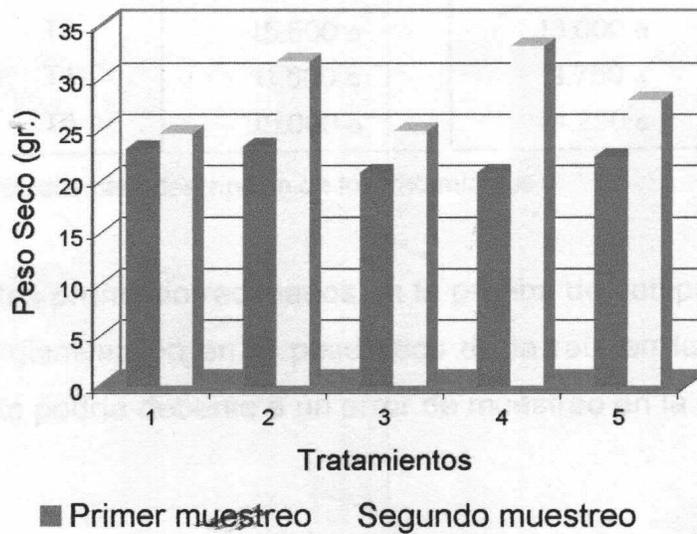
de peso seco, el T4 fue el que presentó mayor valor de peso seco, siendo superior en un 26% con respecto al T1, éste tuvo el menor valor. Con respecto a los tratamientos sin y con *Trichoderma* (T1 y T2 respectivamente) se observó una superioridad del 22% en el T2.

Cuadro N° 7: Datos promedio de peso seco foliar en plantines de *Eucalyptus grandis* en el primer y segundo muestreo.

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Peso seco foliar (gr)	Peso seco foliar (gr)
T1	23.000 a	24.500 a
T2	23.250 a	31.500 a
T3	20.750 a	24.750 a
T4	20.750 a	33.000 a
T5	22.250 a	27.750 a

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos

Gráfico N° 3: Peso seco de parte aérea en el primer y segundo muestreo



5.1.1.4 Peso seco de la raíz

En el anexo 1 se muestra toda la información de los datos de peso seco de raíz recogidos en los dos muestreos realizados y los resultados de las pruebas estadísticas.

El resultado del análisis de varianza realizado con los valores obtenidos de materia seca de raíz, demostró que no existe efecto entre los tratamientos, en ninguno de los momentos evaluados. En la posterior prueba de D.M.S no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

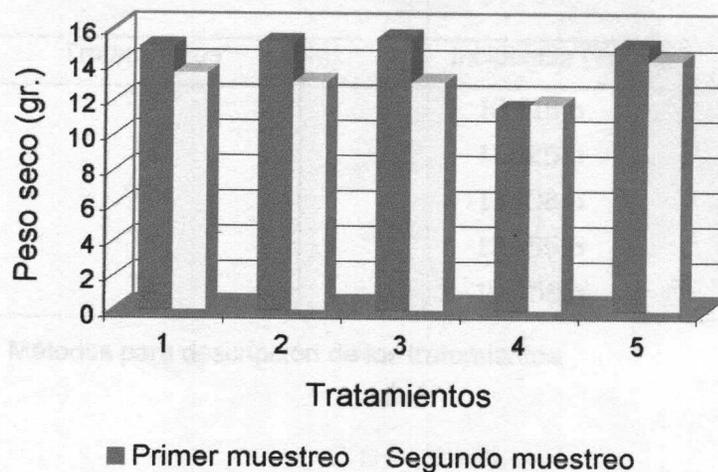
Cuadro N° 8: *Datos promedio de peso seco de raíz en plantines de Eucalyptus grandis, en el primer y segundo muestreo*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Peso seco de raíz (gr.)	Peso seco de raíz (gr.)
T1	15.000 a	13.500 a
T2	15.250 a	13.000 a
T3	15.500 a	13.000 a
T4	11.500 a	11.750 a
T5	15.000 a	14.250 a

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

En los datos promedio recabados en la prueba de comparación múltiple, se observó una disminución en el peso seco de la raíz en la mayoría de los tratamientos, esto podría deberse a un error de muestreo en la manipulación de los plantines.

Gráfica N° 4: *Peso seco radicular en el primer y segundo muestreo.*



5.1.2 Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*

Todos los datos recogidos del muestreo de la enfermedad en plantines de *Eucalyptus grandis*, se presenta en el anexo 2 conjuntamente con los análisis estadísticos.

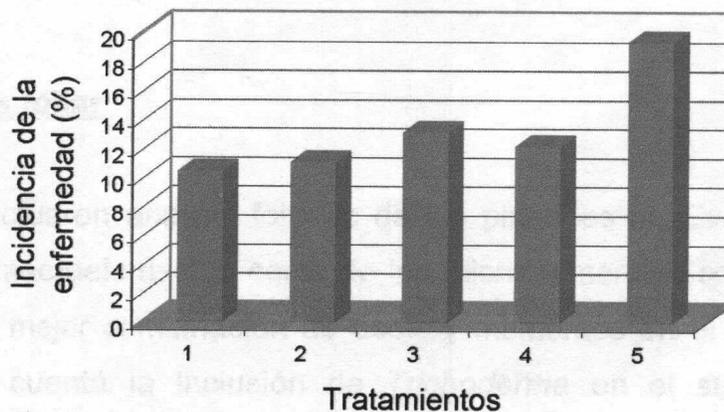
El análisis de varianza demostró que hay alguna diferencia entre los tratamientos, con una confianza del 98%. En la posterior prueba de D.M.S, se pudo observar que el T5 tuvo mayor incidencia de la enfermedad, diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. El T1, al cual no se le inoculó *Trichoderma* al sustrato, fue el que obtuvo mayor cantidad de plantas sanas con respecto al total del ensayo. (Ver cuadro N° 9 y gráfica N° 5)

Cuadro N° 9: *Incidencia de la enfermedad causada por Botrytis cinerea en plantines de Eucalyptus grandis.*

Tratamientos*	Incidencia (%)
T1	10.418 b
T2	11.025 b
T3	13.108 b
T4	12.155 b
T5	19.358 a

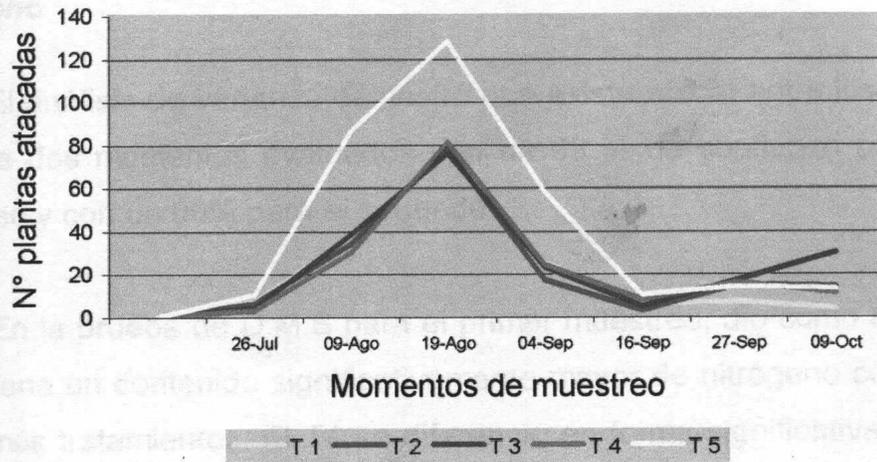
*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Gráfica N° 5: *Incidencia de la enfermedad según tratamiento.*



Como se detalló en el capítulo de Materiales y Métodos, la incidencia de la enfermedad fue evaluada durante todo el ciclo de producción. En la gráfica N° 6 se puede apreciar que el T5 fue el que se mantuvo con mayor número de plantas afectadas durante casi todo el ciclo del cultivo, aunque para la última medición el T3 fue el que tuvo mayor número de plantas afectadas. Para una mejor interpretación del gráfico, se recuerda que en el momento 3 (27/08/02) fue cuando se aplicó la dosis de ROVRAL.

Gráfica N° 6: Desarrollo de la enfermedad a lo largo del ciclo productivo.



5.1.3 Análisis foliar

Se efectuaron análisis foliares de los plantines de *Eucalyptus grandis*, tanto de los macroelementos como de los microelementos, con la finalidad de establecer la mejor combinación de dosis y momentos en el ciclo del cultivo, teniendo en cuenta la inclusión de *Trichoderma* en el sustrato como un elemento nuevo del sistema sustrato-planta en el vivero.

Toda la información obtenida de las variables que se pasaran a detallar seguidamente, en los dos momentos muestreo con el correspondiente análisis estadístico, se presentan en el anexo 3.

5.1.3.1 Macronutrientes

Nitrógeno

El análisis de varianza demostró que existe efecto entre los tratamientos para los dos momentos evaluados con un 99 % de confianza para el primer muestreo y con un 90% para el segundo.

En la prueba de D.M.S para el primer muestreo, dio como resultado que el T3 tiene un contenido significativamente mayor de nitrógeno con respecto a los demás tratamientos. El T4 se diferenció en forma significativa del T1 y T2, siendo éstos los de menor contenido de nitrógeno. En el segundo muestreo se mantuvo que el T3 fue el que presentó mayor contenido de nitrógeno, este resultado fue el esperado ya que se le aplicó una mayor dosis de nitrógeno.

Cuadro N° 10: *Contenido promedio de nitrógeno foliar para el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Nitrógeno (%)	Nitrógeno (%)
T1	3.6900 c	2.9925 b
T2	3.6775 c	3.0250 b
T3	4.2825 a	3.4175 a
T4	3.9050 b	3.1700 ab
T5	3.8225 bc	3.1325 ab

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Gráfica N° 7: Contenido de nitrógeno en los plantines de *Eucalyptus grandis* según el momento de muestreo.



Fósforo

En el análisis de varianza del primer muestreo, se observó que existe por lo menos un tratamiento que difiere del resto, con un 99% de confianza. Sin embargo para el segundo muestreo no se pudo comprobar esta diferencia con una confianza del 61%. A continuación se presenta los resultados de la comparación de medias.

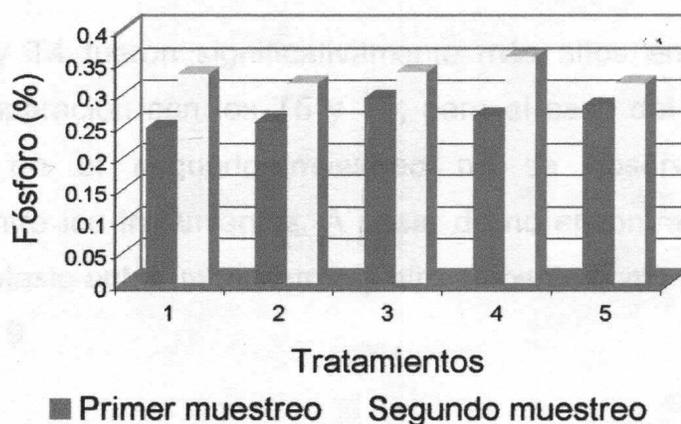
Cuadro N° 11: Contenido promedio de fósforo foliar en el primer y segundo muestreo.

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Fósforo (%)	Fósforo (%)
T1	0.2450 c	0.33000 a
T2	0.2550 c	0.31500 a
T3	0.2925 a	0.33250 a
T4	0.2650 bc	0.35750 a
T5	0.2800 ab	0.31500 a

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Para el primer muestreo, se puede ver en el cuadro N° 11, que el T3 fue el que presentó mayor contenido de fósforo con un valor significativamente diferente a los T2 y T1, siendo este último el que presentó menor contenido de fósforo. Los resultados concuerdan con las dosis aplicadas ya que el T 3 fue al que se le aplicó mayor dosis. En el segundo muestreo los contenidos de fósforo en los diferentes tratamientos se emparejaron.

Gráfica N° 8: Contenido de fósforo en los plantines de *Eucalyptus grandis* según el momento de muestreo.



Potasio

Con un 98% de confianza se puede afirmar que existe diferencia entre tratamientos, para el contenido de potasio foliar, según el análisis de varianza para el primer muestreo, no siendo así en el segundo muestreo con un 64% de confianza.

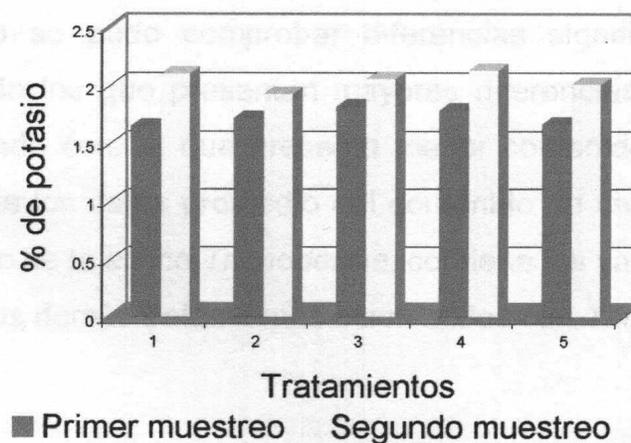
Cuadro N° 12: *Contenido promedio de potasio foliar en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Potasio (%)	Potasio (%)
T1	1.6500 b	2.0975 a
T2	1.7175 ab	1.9200 a
T3	1.8175 a	2.0500 a
T4	1.7825 a	2.1250 a
T5	1.6650 b	2.0050 a

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Los T3 y T4 fueron significativamente más altos en el contenido de potasio en comparación con los T5 y T1, para el caso del primer muestreo. Mientras que en el segundo muestreo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. A pesar de no encontrarse diferencias el contenido de potasio entre un muestreo y otro aumentó como se puede apreciar en la gráfica N° 9.

Gráfica N° 9: *Contenido de potasio en plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento.*



Calcio

Para la variable en estudio, en el caso del primer muestreo, el análisis de varianza no mostró efecto entre tratamientos con un 84% de confianza. Sin embargo en el segundo muestreo se observó efectos entre tratamientos con casi un 99% de confianza.

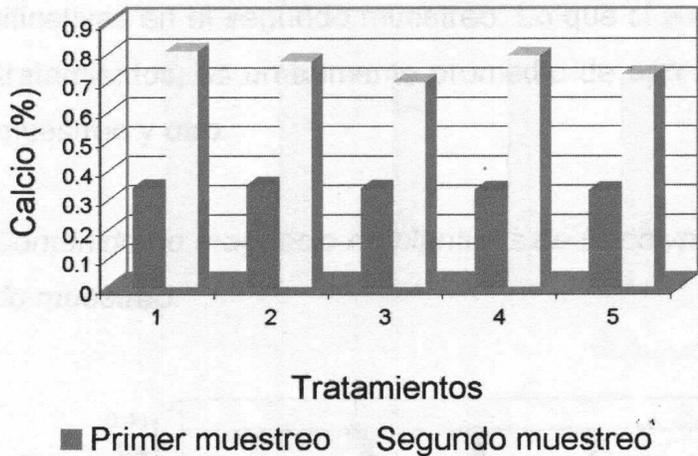
Cuadro N° 13: *Contenido promedio de calcio foliar en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Calcio (%)	Calcio (%)
T1	0.34000 a	0.80250 a
T2	0.34750 a	0.76750 ab
T3	0.33750 a	0.69750 c
T4	0.33250 a	0.78750 a
T5	0.33000 a	0.72250 bc

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

En la prueba de comparación múltiple se constató para el primer muestreo, que no hubieron diferencias significativas entre tratamientos. En el segundo muestreo se pudo comprobar diferencias significativas entre los tratamientos, siendo los que presentan mayores diferencias los T1 y T4 con respecto a T3 siendo éste el que presenta menor contenido de calcio. Si se observan solamente los datos promedio del contenido de calcio, se puede ver que el T1 al cual no se le aplicó *Trichoderma*, contiene los valores más altos en comparación con los demás tratamientos colonizados con *Trichoderma*.

Gráfica N° 10: Contenido de calcio en los plantines de *Eucalyptus grandis* en el primer y segundo muestreo.



Magnesio

El análisis de varianza para el contenido de magnesio foliar en los dos muestreos efectuados, no indicaron efectos entre los tratamientos, con una confianza del 75%, en ambos casos.

Cuadro N° 14: Contenido promedio de magnesio foliar en el primer y segundo muestreo.

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Magnesio (%)	Magnesio (%)
T1	0.1825 b	0.41000 a
T2	0.1950 a	0.41500 a
T3	0.1875 ab	0.41500 a
T4	0.1925 ab	0.41250 a
T5	0.1900 ab	0.42000 a

*Ver Materiales y Métodos para descripción de los tratamientos.

Como se puede ver en el cuadro N° 14, el T2 presentó un contenido de magnesio significativamente superior en comparación con el T1, no encontrándose diferencias entre los demás tratamientos. No existiendo diferencias significativas en el segundo muestreo. Lo que sí se puede observar para todos los tratamientos, es un aumento promedio de aproximadamente un 100% entre un muestreo y otro.

Gráfica N° 11: *Contenido de magnesio en plantines de Eucalyptus grandis en el primer y segundo muestreo.*



5.1.3.2 Micronutrientes

Para todos los micronutrientes evaluados, el análisis de varianza determinó que no hubo efectos entre los tratamientos en los dos momentos muestreados. No se observaron diferencias significativas en la posterior prueba de comparación de medias, para todas las variables en estudio en el primer muestreo, mientras que en el segundo muestreo, la única variable que presentó diferencias significativas fue el manganeso.

Sin bien, no hay diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al contenido de hierro foliar, el T1, al cual no se le agregó *Trichoderma*, fue un 16% superior al promedio de los restantes tratamientos (con *Trichoderma*). Entre el primer y segundo muestreo se observa una gran disminución en todos los tratamientos, alcanzando ésta un valor promedio del 60%.

Para el contenido de manganeso no se observaron diferencias significativas en el primer muestreo, sin embargo en el segundo muestreo el T1 en el cual no se le agregó *Trichoderma*, presentó un contenido de manganeso significativamente mayor al T3, en el que sí se agregó *Trichoderma*. El T1 presentó mayor contenido que los demás tratamientos. Se puede observar que para todos los tratamientos hubo un aumento entre el primer muestreo y el segundo.

Como se puede apreciar en el cuadro N° 15 no hay diferencias significativas para el contenido de cobre entre tratamientos para ninguno de los dos momentos de muestreo; asimismo, tampoco se mantiene la misma ubicación de los tratamientos dentro del ranking. Se puede observar únicamente un aumento de los contenidos de cobre promedio en el segundo muestreo.

En la prueba de comparación de medias para el contenido de zinc, la cual se observa en el cuadro N° 15 no se evidencian diferencias significativas entre los tratamientos para los dos muestreos. En el primer muestreo, se observa que el T1 (sin *Trichoderma*) fue el que presentó menor contenido de zinc y el T2 (con *Trichoderma*) el de mayor contenido, superándolo este último en un 12%. Según los datos promedio, el T1 pasó de ser el que presentaba menor valor en el primer muestreo a ser el de mayor contenido de zinc en el

segundo muestreo; sin embargo para el resto de los tratamientos no se observaron grandes cambios.

Cuadro N° 15: *Contenido promedio de los micronutrientes evaluados en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Hierro (ppm)		Manganeso (ppm)		Cobre (ppm)		Zinc (ppm)	
	1° **	2° **	1° **	2° ***	1° **	2° **	1° **	2° **
T1	326.00	137.75	601.00	1200.75	9.00	13.75	24.50	34.00
T2	243.00	125.00	654.50	1095.50	9.00	13.50	27.25	32.75
T3	338.75	115.75	593.25	985.50	8.75	14.25	26.50	30.50
T4	247.25	96.75	618.25	1079.50	8.50	13.75	25.75	29.50
T5	267.50	91.75	588.00	1082.00	8.50	14.25	26.50	31.25

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

** Resultados sin diferencias significativas.

*** Resultados con diferencias significativas.

1° y 2° significa; primer y segundo muestreo respectivamente.

5.2 RESULTADOS DE LAS MEDIDAS REALIZADAS EN EL SUSTRATO

5.2.1 Análisis químico del sustrato de partida

Al comienzo del ensayo, se realizó el análisis químico del sustrato antes de la siembra. Los datos se presentan en el cuadro N° 16.

Cuadro N° 16: *Análisis químico del Sustrato utilizado en la siembra*

	Sustrato con Trichoderma	Sustrato sin Trichoderma
C (%)	28	25
C/N	42.4	39.7
N (%)	0.66	0.63
P (%)	0.11	0.11
K (%)	0.069	0.079
Ca (%)	0.3	0.4
Mg (%)	0.06	0.06
Cu (ppm)	15	15
Fe (ppm)	10223	9441
Mn (ppm)	445	426
Zn (ppm)	15	16
Ph	4.97	4.7
Conduct.(mS/cm)	0.67	0.96

5.2.2 Análisis químico del sustrato en el primer y segundo muestreo

Toda la información obtenida de las variables que se pasarán a detallar a continuación, en los dos momentos del muestreo con el correspondiente análisis estadístico se presenta en el anexo 4.

5.2.2.1 Carbono

En el análisis de varianza no se vieron efectos entre los tratamientos, con una confianza del 70%, para el primer muestreo. Mientras que en el segundo muestreo, se pudo comprobar que por lo menos uno de los tratamientos se diferencia del resto, con un 98%. La posterior prueba de comparación múltiple da los siguientes resultados:

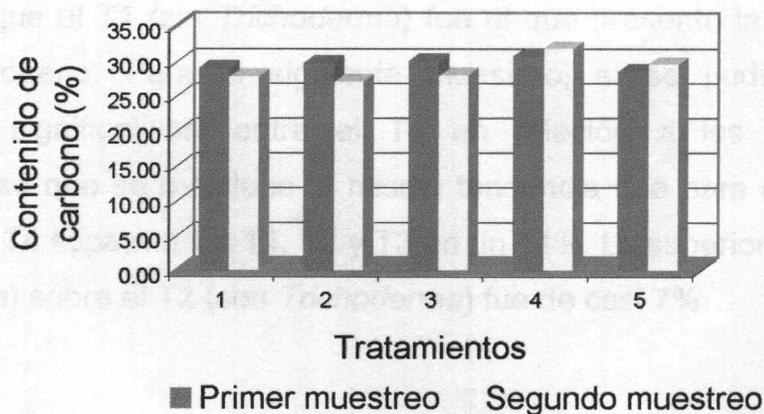
Cuadro N° 17: *Contenido promedio de carbono en el sustrato para el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Carbono (%)	Carbono (%)
T1	29.000 ab	27.750 b
T2	29.750 ab	27.000 b
T3	30.000 ab	28.000 b
T4	30.750 a	31.750 a
T5	28.500 b	29.500 ab

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Se vieron diferencias significativas entre el T4 y el T5, siendo el contenido del carbono en el T4 significativamente superior, superándolo en un 7.3%. Para el segundo muestreo se pueden apreciar diferencias significativas entre el T4 versus los T1, T2 y T3. El T4 resulta ser un 10 % mayor al promedio de los restantes tratamientos mencionados.

Gráfica N° 12: *Contenido de carbono en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento.*



5.2.2.2 Relación carbono/nitrógeno

El resultado del análisis de varianza realizado con los valores de la variable mencionada, obtenidos en el primer muestreo, demostró que no existe efecto entre los tratamientos. No siendo así, para el segundo muestreo, donde sí se pudo comprobar alguna diferencia entre los mismos, con un 98% de confianza.

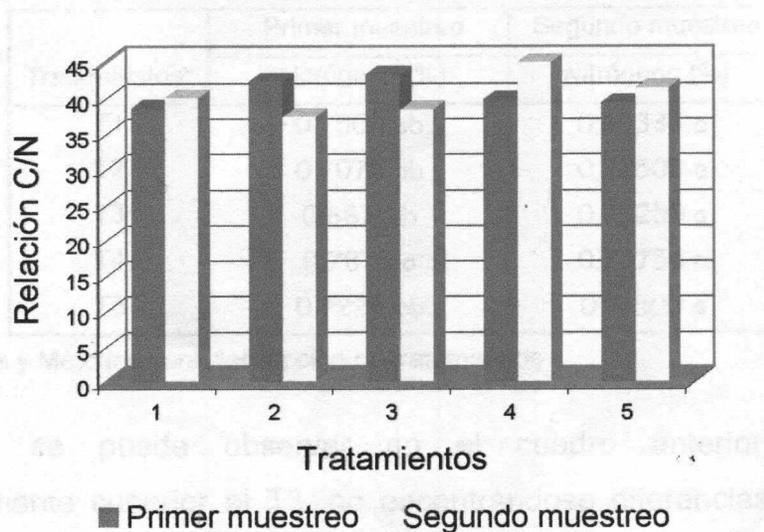
Cuadro N° 18: *Valor promedio de la relación carbono/nitrógeno en el sustrato para el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	C / N	C / N
T1	38.500 a	39.904 b
T2	42.250 a	37.279 b
T3	43.250 a	38.311 b
T4	39.750 a	44.858 a
T5	39.250 a	41.325 ab

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Como se puede apreciar en el cuadro superior, para el primer muestreo no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos; igualmente se puede ver que el T1 (sin *Trichoderma*) fue el que presentó la menor relación carbono/nitrógeno. Para el siguiente muestreo, sí se pudieron encontrar diferencias significativas, entre el T4 en relación a los T1, T2 y T3, observándose que se mantiene la misma tendencia que para el contenido de carbono. El T4 supera a los T1, T2 y T3 en un 14%. La superioridad del T1 (sin *Trichoderma*) sobre el T2 (con *Trichoderma*) fue de casi 7%.

Gráfica N° 13: Valor de la relación carbono/nitrógeno en el sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento.



5.2.2.3 Macronutrientes

Nitrógeno

El análisis de varianza, para ambos muestreos, determinó que no había diferencias entre los tratamientos. A continuación se presenta la posterior prueba de comparación de medias, en la que se observaron los siguientes resultados:

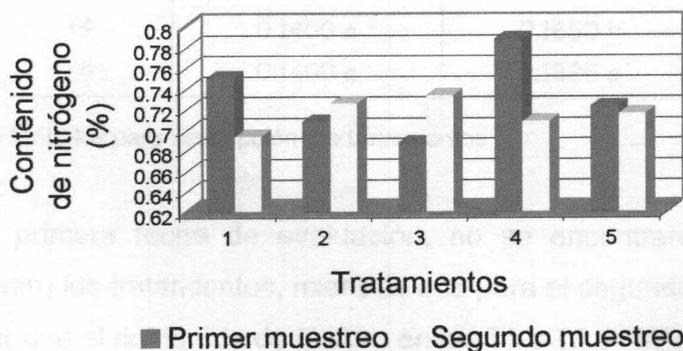
Cuadro N° 19: Contenido promedio de nitrógeno en el sustrato para el primer y segundo muestreo.

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Nitrógeno (%)	Nitrógeno (%)
T1	0.7500 ab	0.69333 a
T2	0.7075 ab	0.72500 a
T3	0.6875 b	0.73250 a
T4	0.7875 a	0.70750 a
T5	0.7225 ab	0.71500 a

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Como se puede observar en el cuadro anterior, el T4 es significativamente superior al T3, no encontrándose diferencias significativas entre los demás tratamientos. El T4 muestra una superioridad del 13% con respecto al T3, siendo a su vez éste el de menor valor, mientras que en el segundo muestreo, éste pasa a ser el tratamiento que presenta mayor contenido de nitrógeno, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos para el segundo muestreo.

Gráfica N° 14: Contenido de nitrógeno en el sustrato utilizado para la producción de plántines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento.



En la gráfica N° 14, se puede ver claramente que únicamente los T2 y T3, fueron los que presentaron un incremento entre los dos momentos de muestreo, a diferencia del resto de los tratamientos en los cuales se pudo ver una clara disminución en el contenido de nitrógeno al final del ciclo productivo. La mayor disminución la presentó el T4, siendo el valor de la misma de un 10%.

Fósforo

El análisis de varianza para el contenido de fósforo en el sustrato, para el primer muestreo, no determinó que hubieran efectos entre tratamientos, mientras que en el segundo muestreo, sí se pudo comprobar que existe por lo menos un tratamiento que difiere del resto, con un 99.9 % de confianza.

Cuadro N° 20: *Contenido promedio de fósforo en el sustrato para el primer y segundo muestreo.*

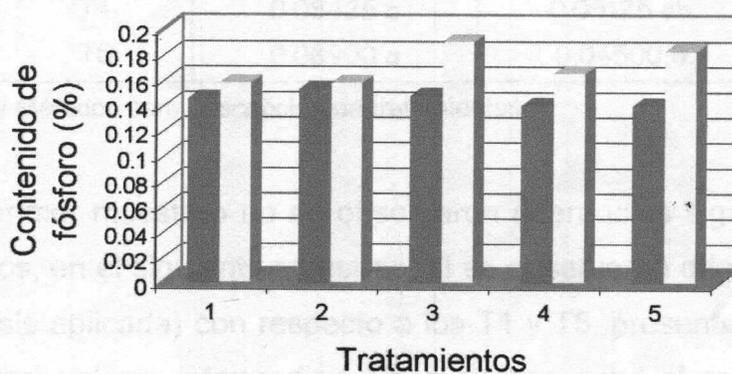
Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Fósforo (%)	Fósforo (%)
T1	0.1450 a	0.1575 b
T2	0.1525 a	0.1575 b
T3	0.1475 a	0.1900 a
T4	0.1400 a	0.1650 b
T5	0.1400 a	0.1825 a

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Para la primera fecha de evaluación, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que para el segundo muestreo, se puede observar que el contenido de fósforo en los T3 y T5 es significativamente superior a los restantes tratamientos. El T3, fue el al que se le aplicó la mayor

cantidad del nutriente mencionado, por lo tanto era esperable que al final del ciclo de producción, presentara el mayor valor, siendo éste un 17% superior al T1 y T2, que presentaron el menor contenido.

Gráfica N° 15: *Contenido de fósforo en el sustrato utilizado para la producción de plantines de Eucalyptus grandis según tratamiento.*



■ Primer muestreo ■ Segundo muestreo

Potasio

El análisis de varianza realizado con los valores de contenido de potasio, obtenidos en el primer muestreo, demostró que no existe efecto entre los tratamientos, con un 66% de confianza. Para el segundo muestreo, se pudo comprobar lo contrario, con un 91% de confianza.

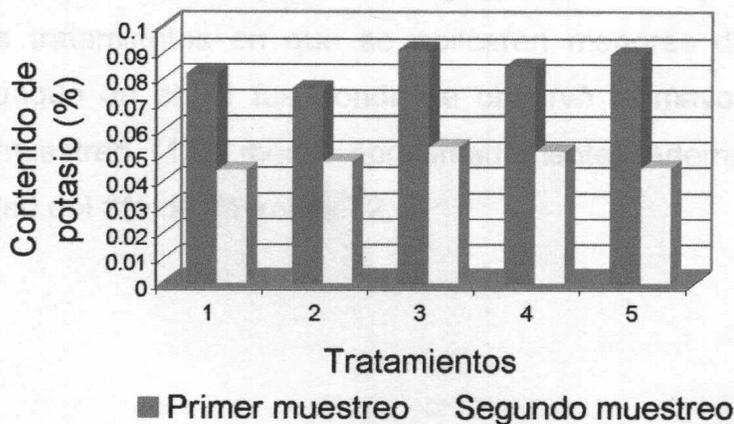
Cuadro N° 21: Contenido promedio de potasio en el sustrato para el primer y segundo muestreo.

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Potasio (%)	Potasio (%)
T1	0.08150 a	0.04400 b
T2	0.07575 a	0.04725 ab
T3	0.09100 a	0.05300 a
T4	0.08425 a	0.05125 ab
T5	0.08900 a	0.04500 b

*Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

En el primer muestreo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, en el siguiente muestreo, sí se observaron diferencias entre el T3 (mayor dosis aplicada) con respecto a los T1 y T5, presentando el resto de los tratamientos, valores intermedios. En el tiempo entre el primer y segundo muestreo, fue cuando el cultivo recibió la mayor cantidad de potasio, a pesar de esto, el contenido promedio del nutriente mencionado, bajo un 43% aproximadamente.

Gráfica N° 16: Contenido de potasio en el sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento.



Calcio

El análisis de varianza para el primer muestreo, demostró que hay alguna diferencia entre los tratamientos, con una confianza del 99%, a diferencia del segundo muestreo en el que no se pudieron comprobar dichos efectos con un 83% de confianza.

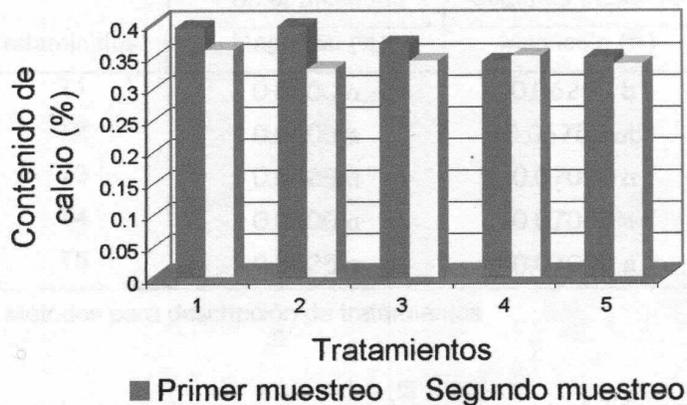
Cuadro N° 22: *Contenido promedio de calcio en el sustrato para el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Calcio (%)	Calcio (%)
T1	0.3950 a	0.36000 a
T2	0.3975 a	0.33000 b
T3	0.3700 ab	0.34250 ab
T4	0.3425 b	0.35000 ab
T5	0.3475 b	0.33750 ab

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Como se puede observar en el cuadro anterior para el primer muestreo, los T1 y T2, tiene contenidos de calcio significativamente mayores a los T4 y T5. Para el primer muestreo el tratamiento que presentó el mayor contenido de calcio fue el T2, mientras que en el segundo fue el T1, pero en los dos casos fueron los tratamientos en que se aplicaron menores dosis de fertilización (NPK). Aunque en el T2 fue donde se observó la mayor disminución en el segundo muestreo, (17% menos aproximadamente). Además se comprobó una superioridad del 8% de T1 sobre T2.

Gráfica N° 17: Contenido de calcio en el sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento.



Magnesio

El análisis de varianza para el contenido de magnesio en los dos muestreos no presentó efectos entre los tratamientos, con una confianza del 82% y 42% para el primer y segundo muestreo respectivamente. En la posterior prueba de comparación múltiple, para el segundo muestreo, se pudieron observar diferencias significativas entre los tratamientos, las cuales se presentan seguidamente.

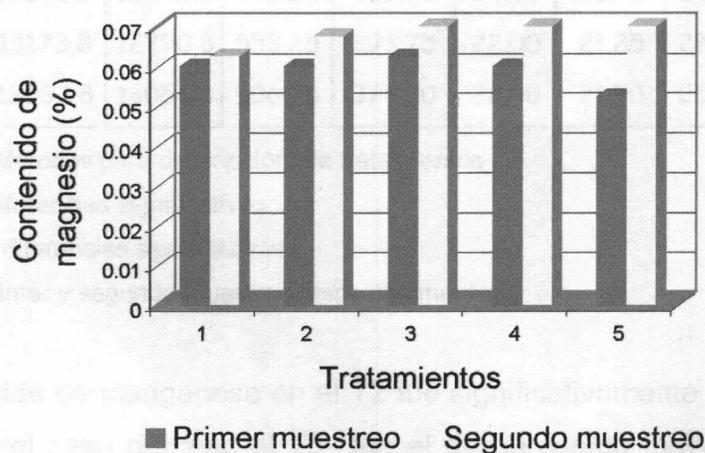
Cuadro N° 23: Contenido promedio de magnesio en el sustrato para el primer y segundo muestreo.

Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Magnesio (%)	Magnesio (%)
T1	0.0600 a	0.06250 b
T2	0.0600 a	0.06750 ab
T3	0.0625 a	0.07000 a
T4	0.0600 a	0.07000 a
T5	0.0525 a	0.07000 a

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

En el segundo muestreo se puede observar que el T1 (sin *Trichoderma*) fue significativamente diferente al resto, presentando el menor valor en el contenido de magnesio, no visualizándose diferencias entre el resto de tratamiento en sustrato colonizado con *Trichoderma*.

Gráfica N° 18: Contenido de magnesio en el sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento.



5.2.2.4 Micronutrientes

Los micronutrientes evaluados fueron, hierro, manganeso, cobre y zinc. El análisis de varianza para todos los micronutrientes mencionados, en los dos momentos de muestreo no presentaron efectos entre los tratamientos. La posterior prueba de comparación múltiple dio como resultado que la mayoría de los micronutrientes no presentaron diferencias significativas entre sus tratamientos, en ninguno de los dos momentos evaluados; a diferencia del manganeso y el zinc, los cuales tuvieron diferencias significativas en el segundo muestreo. Lo expresado anteriormente se puede ver en el cuadro siguiente.

Cuadro N° 24: *Contenido promedio de los micronutrientes en el sustrato para el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Hierro (ppm)		Manganeso (ppm)		Cobre (ppm)		Zinc (ppm)	
	1° **	2° **	1° **	2° ***	1° **	2° **	1° **	2° ***
T1	12681.0	13095.0	492.50	404.50	23.00	19.75	26.75	29.50
T2	12561.8	13122.0	491.25	430.75	21.50	20.75	26.75	31.25
T3	12852.0	12948.3	493.25	402.50	24.25	20.75	31.50	33.75
T4	13173.8	12790.8	553.25	393.75	22.00	21.25	28.75	35.50
T5	12583.8	13056.8	506.75	377.00	22.00	21.50	25.75	37.00

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

** Resultados sin diferencias significativas.

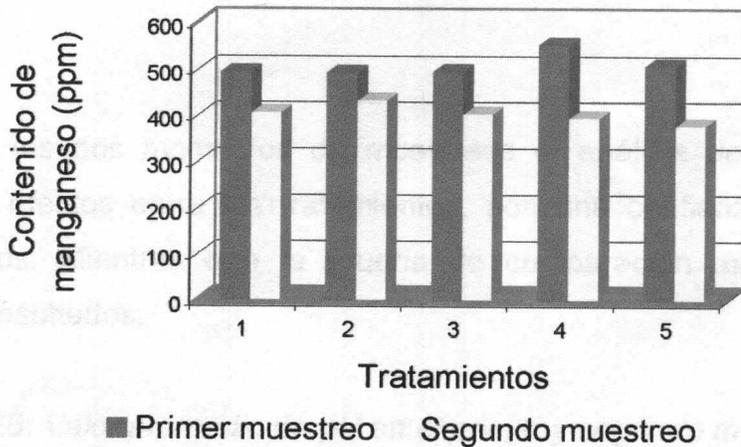
*** Resultados con diferencias significativas.

1° y 2° significa; primer y segundo muestreo respectivamente.

El contenido de manganeso en el T2 fue significativamente mayor (12%) al del T5. Para el caso del zinc el T5 fue el que presentó mayor contenido, diferenciándose significativamente en un 18%, de los T1 y T2.

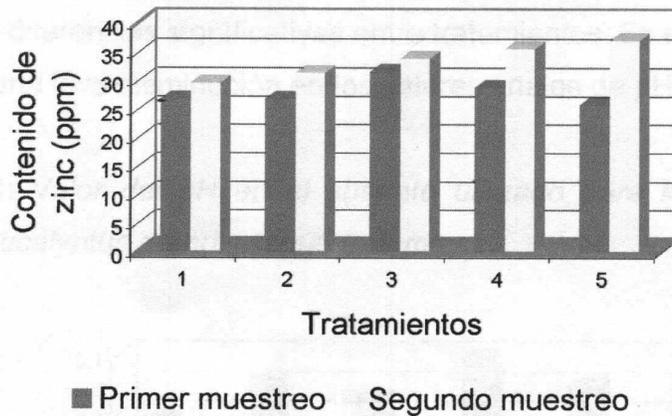
En el segundo muestreo se observó una disminución en el contenido de manganeso y cobre, mientras que los contenidos de zinc y hierro, se mantuvieron prácticamente constantes registrando para ambos caso un aumento máximo del 4%. Para el caso del manganeso, el que presentó mayor disminución fue el T4 con un valor de 29%, en contraste, el que presentó una menor disminución fue el T2 con un 12%. (Ver gráfica N°19) La mayor depresión en el contenido de cobre la presentaron los T1 y T3 con un 14% y la menor disminución se observó en el T5 (2%).

Gráfica N° 19: Contenido de manganeso en el sustrato utilizado para la producción de plántulas de *Eucalyptus grandis* según tratamiento



Treatment	First Sample (ppm)	Second Sample (ppm)
T1	4.8210	4.5750
T2	4.9017	4.6224
T3	4.8875	4.6720
T4	5.0295	4.6420
T5	5.0000	4.7500

Gráfica N° 20: Contenido de zinc en el sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento



5.2.2.5 PH

Para los dos momentos de muestreos el análisis de varianza no se observaron efectos entre los tratamientos, con una confianza del 83% para ambos casos. Mientras que la prueba de comparación múltiple arrojó los siguientes resultados:

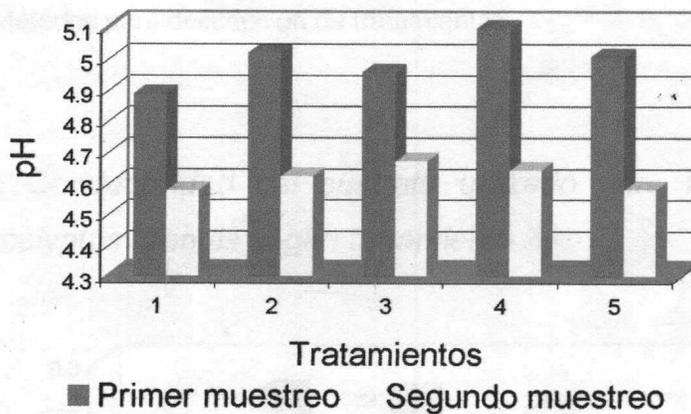
Cuadro N° 25: Valor promedio de pH en el primer y segundo muestreo.

Tratamientos	Primer muestreo	Segundo muestreo
	pH	pH
T1	4.885 b	4.575 a
T2	5.017 ab	4.622 a
T3	4.955 ab	4.670 a
T4	5.095 a	4.640 a
T5	5.005 ab	4.580 a

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

El resultado de la prueba de D.M.S. determina que el T4 es el que presentó un valor de pH más elevado y el único que se diferencia significativamente del T1 para el primer muestreo. En el segundo muestreo no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. En el cuadro anterior se puede ver una leve disminución en los valores finales de pH.

Gráfica N° 21: Valor del pH en el sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento



5.2.2.6 Conductividad

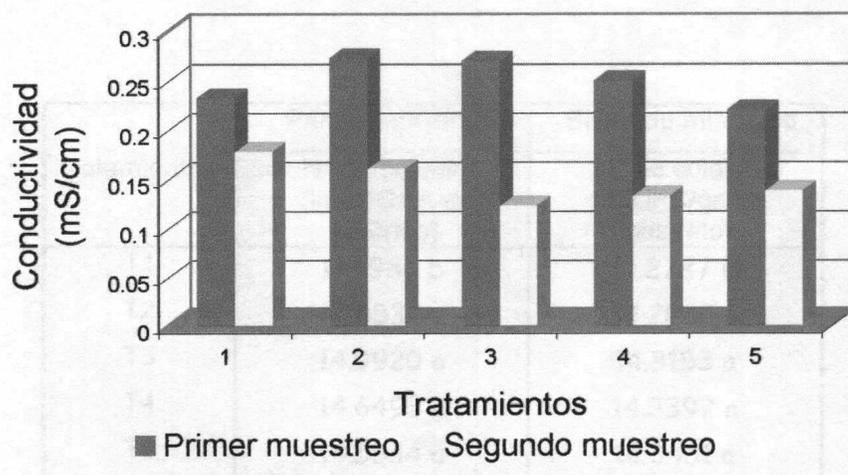
Para la variable conductividad, el análisis de varianza en ambos muestreos determinó que no había diferencias entre los tratamientos, con una confianza del 41%. En la posterior prueba de comparación múltiple tampoco se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Se observó una disminución en los valores de conductividad en el segundo muestreo. El tratamiento que presentó la mayor disminución en la concentración de sales fue el T3, siendo ésta de un 55%, y el T1 disminuyó un 24%, registrando el menor valor. (Ver gráfica N° 22)

Cuadro N° 26: Valor promedio de conductividad en el primer y segundo muestreo.

Tratamientos	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Conductividad	Conductividad
T1	4.885 b	4.5750 a
T2	5.017 ab	4.6225 a
T3	4.955 ab	4.6700 a
T4	5.095 a	4.6400 a
T5	5.005 ab	4.5800 a

*Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Gráfica N° 22: Conductividad del sustrato utilizado para la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* según tratamiento



5.2.3 Conteo de colonias de *Trichoderma harzianum*

En el anexo 5, se presentan toda la información de los datos respecto a los recuentos de *Trichoderma* en el sustrato en los dos momentos de muestreo y su respectivo análisis de varianza. Para realizar en análisis estadístico de la variable en estudio, todos los valores se transformaron a logaritmo neperiano (ln).

En los análisis de varianza, para los dos muestreos, se pudo observar que hubo un efecto entre los tratamientos, con una confianza mayor al 99%. A continuación se presenta la posterior prueba de comparación múltiple para los tratamientos en cada una de las fechas de análisis.

Cuadro N° 27: *Número promedio de colonias de Trichoderma harzianum en el sustrato para el primer y segundo muestreo.*

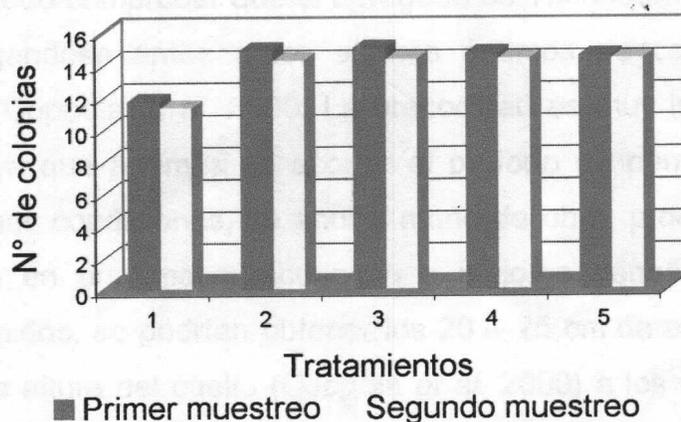
Tratamientos*	Primer muestreo	Segundo muestreo
	N° de colonias (ln UFC/gr. de sustrato)	N° de colonias (ln UFC/gr. de sustrato)
T1	11.6980 b	11.2787 b
T2	14.8535 a	14.2080 a
T3	14.9920 a	14.3153 a
T4	14.6493 a	14.3397 a
T5	14.5034 a	14.3451 a

* Ver Materiales y Métodos para descripción de tratamientos

Como se puede apreciar en el cuadro anterior, para los dos muestreos se mantuvo la misma tendencia esperada, el T1 fue el que presentó menor número de colonias, siendo éste el tratamiento al que no se le aplicó *Trichoderma*,

mientras que, entre los restantes tratamientos no se observaron diferencias significativas. También se puede ver claramente una disminución en el número de colonias en el segundo muestreo, siendo en los T4 y T5 donde se observó una menor reducción de las colonias, con un 2 y un 1% respectivamente. Para el caso de los T3, T4 y T5 la reducción fue más pareja (aproximadamente un 4%).

Gráfica N° 23: Número promedio de colonias de *Trichoderma harzianum* en el sustrato para el primer y segundo muestreo.



6. DISCUSIÓN

6.1. CALIDAD DE PLANTINES

6.1.1 Parámetros morfológicos

Para la determinación del óptimo desarrollo de los plantines de *Eucalyptus grandis*, creciendo en sustrato colonizado con *Trichoderma harzianum*, se observó una clara tendencia para los parámetros morfológicos evaluados. Se pudo comprobar que el agregado de *Trichoderma* acorta el ciclo del cultivo, llegándose antes a los valores óptimos de calidad de planta propuestos por Coppola *et al.* 2000. La precocidad es muy importante en un vivero forestal ya que además de acortar el período de permanencia de las plantas en dichas condiciones, se ahorra mano de obra, productos químicos, etc., resultando en una mayor economía y mejores beneficios. Según los resultados obtenidos, se podrían obtener los 20 – 25 cm de altura y 2 – 3 mm de diámetro a la altura del cuello (Coppola *et al.* 2000) a los cuatro meses de edad del cultivo, mientras que con la producción convencional, se logran dichos valores a los cinco o seis meses de desarrollo del cultivo.

Se observó que los plantines de *Eucalyptus grandis* creciendo en sustrato colonizado con *Trichoderma*, presentaron mayor altura, diámetro a la altura del cuello y peso seco, en comparación con el testigo (T1). (Ver gráfica N° 1, 2 y 3) El aumento en los parámetros morfológicos, se podría atribuir al efecto de *Trichoderma* como promotor del crecimiento, Rabeendran *et al.* (2000) afirman lo mencionado anteriormente. Para el tratamiento con *Trichoderma* se constató un 11% de superioridad en altura y un 13% en el diámetro a la altura del cuello, para el primer muestreo, ya que para el segundo

muestreo los valores obtenidos para la calidad de planta sobrepasan los niveles estándar y a su vez la tendencia se mantiene pero los porcentajes disminuyen. Según Guerreiro y Colijunior, 1984 (citado por De Araujo, 1995) el rango de altura estaría comprendido entre 15 y 35 cm. y el diámetro mayor a 2 mm, por lo que en el primer muestreo se estarían alcanzando estos valores para todos los tratamientos en la variable altura y para el diámetro del tratamiento 2.

El peso seco de los plantines con *Trichoderma*, fue superior en comparación al testigo, mostrando un mayor porcentaje para el segundo muestreo (22%). Esto indicaría que hay un mayor aprovechamiento de los nutrientes disponibles en el sustrato y del aporte de fertilizante cuando el sistema contiene un microorganismo. (Lo *et al.* 1997) Como se mencionó, el resultado fue observado en el segundo muestreo, lo cual podría deberse a un efecto primario de inmovilización por parte de *Trichoderma*, para luego liberar los nutrientes por mineralización, evitando pérdidas por riegos excesivos.

A través de una adecuada fertilización las plantas adquieren una mejor adaptación al nuevo sitio, debido a que el agregado de nutrientes contribuye a un adecuado desarrollo de la parte aérea y radicular. Según un estudio (datos no publicados), el cual se llevo a cabo paralelamente al ensayo presentado, el promedio de altura final para plantines creciendo en sustrato no colonizado con *Trichoderma* y en ausencia de fertilización, fue de 40 cm. y para aquellos creciendo también sin el agregado de fertilizantes con la diferencia de presentar *Trichoderma* en el sustrato, se obtuvo un promedio de altura de 47 cm., presentando una altura inferior del 22% y del 13% respectivamente, con respecto a los que sí se les agrego nutrientes. (Ver cuadro N° 5)

Se puede deducir de los datos anteriores que la fertilización tuvo un efecto positivo en la altura de los plantines, igualmente a partir de los datos del

ensayo, se observó que se debe tener en cuenta el balance entre macronutrientes N P K y las dosis aplicadas. Se pudo comprobar que a mayores dosis de nutrientes correspondieron mayores alturas y entre los macronutrientes, el nitrógeno fue el que más influyó en el parámetro evaluado. (Ver anexo 1) Sin embargo no se justificarían las mayores dosis de nutrientes para obtener una altura final de 25-30 cm. como se indica en la bibliografía, debido a que al final del ensayo se pudo constatar que los plantines creciendo con mayores dosis, fueron solamente un 2 % más altos. (Ver gráfica N° 24)

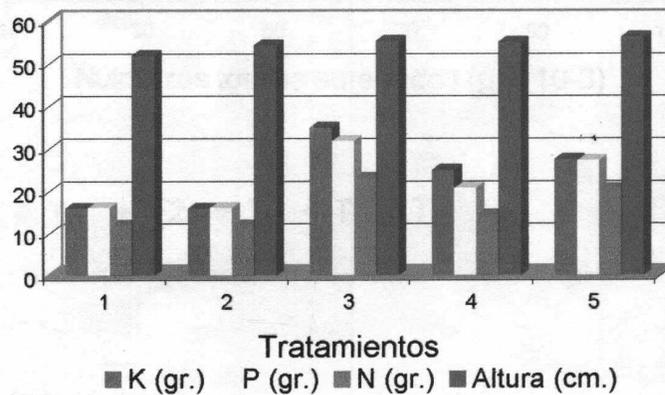
Se logró apreciar que existe respuesta al agregado de nutrientes en el diámetro a la altura del cuello, a mayores dosis de macronutrientes, N P K se observa una tendencia a aumentar el diámetro de los plantines. (Ver anexo 1) Este efecto se puede visualizar al final del ciclo productivo siendo más notorio para el fósforo y el potasio, sin embargo se llega al diámetro recomendado con las menores dosis aplicadas. Por lo expresado anteriormente se vuelve a concluir que no se justificaría el agregado de mayores dosis de nutrientes. (Ver gráfica N° 25)

En el ensayo se pudo observar que la fertilización tuvo un efecto inverso sobre el peso seco, a diferencia de lo expresado para las variables altura y diámetro. A mayores dosis de fertilizantes el peso seco de los plantines se vio disminuido. El tratamiento al cual se le aplicó las mayores dosis de nutrientes (T 3) presentó un peso seco menor (21%) en comparación al tratamiento 2. Al final del ensayo el tratamiento 4 tuvo similar peso seco que el tratamiento 2. Por lo tanto se cree que no se justifica los mayores gastos de fertilizante, si con menores dosis se obtienen mejores o iguales resultados. (Ver gráfica 26)

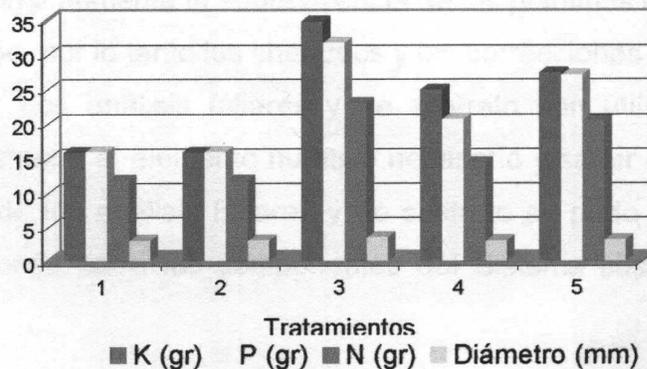
La disminución del peso seco radicular para el final del ciclo productivo se atribuye a partir de apreciaciones visuales, a una mayor cantidad de raíces

secundarias y terciarias las cuales no fueron contabilizadas por desprenderse de la planta y quedarse adheridas al sustrato durante el muestreo. Los tratamientos creciendo en sustrato colonizado con *Trichoderma* presentaron un mayor desarrollo radicular y a diferencia del tratamiento 1, éste presento mayor cantidad de raíces primarias o de anclaje. (Ver foto Anexo 6)

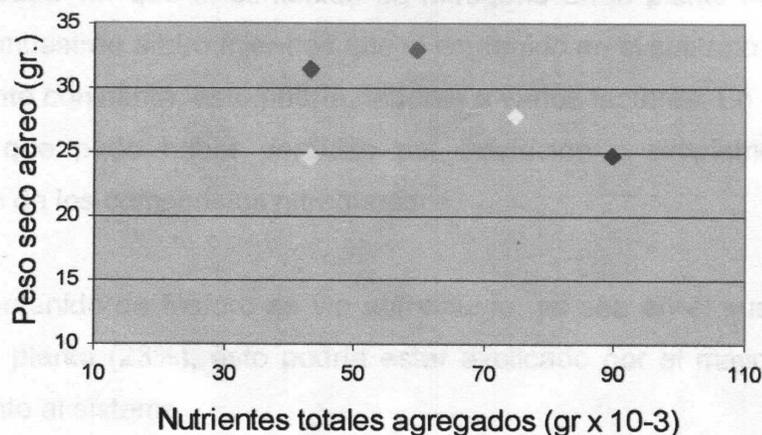
Gráfica N° 24: Efecto de las dosis de nutrientes en la altura de plantines de *Eucalyptus grandis*.



Gráfica N° 25: Efecto de las dosis de nutrientes en el diámetro a la altura del cuello en plantines de *Eucalyptus grandis*.



Gráfica N° 26: *Peso seco aéreo según nutrientes totales agregados.*



◆ T1 ◆ T2 ◆ T3 ◆ T4 ◆ T5

6.1.2 Parámetros fisiológicos

Un adecuado balance de nutrientes es importante para la producción y mantenimiento de plantas de calidad. Como se mencionó anteriormente un buen estado nutricional aumenta la sobrevivencia de los plantines cuando éstos son llevados a campo, por lo tanto los chequeos y las correcciones nutricionales son fundamentales. Los análisis foliares y de sustrato son utilizados como herramienta para detectar el elemento nutritivo necesario y saber en que dosis aplicarlo. A través de los análisis foliares y de sustrato se pudo observar las diferentes interacciones entre los componentes del Sistema sustrato-plantín-*Trichoderma*.

Analizando la posible interacción existente entre los nutrientes y la planta, se pudo ver que el contenido de nitrógeno en la planta disminuyó un 19% de un muestreo a otro mientras que el contenido en el sustrato permaneció prácticamente constante, esto podría deberse a varios factores. En primer lugar se piensa que pudo haber pérdidas por lixiviación o simplemente por el catabolismo de los compuestos nitrogenados.

El contenido de fósforo se vio aumentado, ya sea en el sustrato (18%) como en la planta (23%), esto podría estar explicado por el mayor aporte de este elemento al sistema.

Se observó una gran disminución en el contenido de potasio en el sustrato (50%) mientras que en la planta se vio un aumento del 18%, se piensa que dichos cambios pueden ser debidos a los mayores requerimientos de la planta de este nutriente al final del ciclo productivo; no se descartan las pérdidas por lixiviación.

Cuando se realizó el primer muestreo, la planta presentó contenidos de calcio por debajo de los valores requeridos por la planta, según los datos aportados en la revisión bibliográfica (0.4%). Entre el primer y segundo muestreo se llevaron a cabo las fertilizaciones con calcio, pudiéndose así corregir dicha deficiencia, produciéndose un aumento del contenido de calcio foliar del 123%, mientras que en el sustrato se mantuvo prácticamente constante, por tal motivo se piensa que la totalidad del calcio aplicado podría haber sido tomado por la planta.

Cuadro N° 28: *Dinámica de los nutrientes en el Sistema sustrato-planta.*

Nutrientes	Planta	Sustrato
N	19% ↓	2% ↔
P	23% ↑	18% ↑
K	18% ↑	50% ↓
Ca	123% ↑	7% ↓
Mg	118% ↑	15% ↑
Fe (%)	60% ↓	2% ↔
Mn	78% ↑	21% ↓
Cu	37% ↑	8% ↓
Zn	21% ↑	20% ↑

En lo que respecta a la interacción de *Trichoderma* con los nutrientes, se comparó solamente el tratamiento 1 con el 2, ya que ambos recibieron las mismas dosis de fertilizantes. Se pudo comprobar que para la mayoría de los nutrientes evaluados no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2, con la excepción del magnesio y el manganeso. El tratamiento 2 presentó mayor contenido foliar de ambos nutrientes mientras que los contenidos en el sustrato fueron iguales para los dos tratamientos, por lo tanto se piensa que *Trichoderma* estaría aumentando la disponibilidad de estos nutrientes para la planta, como lo menciona Altomare *et al.* (1999) *Trichoderma* tendría la capacidad de solubilizar el magnesio y el manganeso, además de otros micronutrientes como es el zinc, para el cual no se observaron grandes

diferencias como para los anteriores, pero sí la misma tendencia. (Ver cuadro N° 28)

Como se mencionó en la revisión bibliográfica el hierro es fundamental para el crecimiento de *Trichoderma*, esto se pudo comprobar en el presente ensayo ya que los niveles de hierro en el sustrato de Tratamiento 1 y 2 fueron prácticamente similares (menor a un 1%) mientras que el contenido foliar de dicho elemento fue menor para T2.(26%). (Ver cuadro N° 29). La absorción de éste podría haber sido afectada por las interacciones que existen con otros elementos como ser : potasio, magnesio, cobre, manganeso y zinc.

Cuadro N° 29: Contenido de nutrientes promedios de los tratamientos 1y 2

Nutrientes	Tratamiento 1		Tratamiento 2	
	Foliar	Sustrato	Foliar	Sustrato
Mg (%)	0.1825	0.06	0.1950	0.06
Fe (ppm)	326.00	12.681	243.00	12.561
Mn (ppm)	601.00	492.5	654.5	491.5
Zn (ppm)	24.5	26.75	27.25	26.75

6.2 SANIDAD DE PLANTINES

Las condiciones ambientales de humedad y temperatura que prevalecieron en el corriente año favorecieron el desarrollo de la enfermedad, según datos nacionales en vivero forestales el nivel de incidencia de *Botrytis cinerea* fue cercano al 50%, presentándose en el ensayo un 20 % en el momento de máximo ataque. Es importante considerar que en este ensayo no

se aplicaron productos químicos para el control de *Botrytis* salvo cuando se disparó la infección en el momento en que el cultivo presentaba 14 semanas de edad, en la cual una sola aplicación de Rovral y una aplicación complementaria de *Trichoderma* vía foliar frenaron el ataque.

El ciclo del patógeno fue igual para todos los tratamientos aunque la incidencia en el tratamiento 5 fue mayor. Esto podría deberse a que tanto el tratamiento 3 como el 5 tuvieron un excesivo riego en los primeros estadios de crecimiento, debido a que la concentración de sales fue mayor al resto de los tratamientos. Esto coincide con la bibliografía consultada. (National Academy of Sciences, 1978) Otro factor que estaría influenciando, podría ser un desbalance nutricional lo cual se recomienda que sea motivo para futuras investigaciones, debido a que los tratamientos más equilibrados como ser los tratamientos 1 y 2 tuvieron menor incidencia. Se pudo observar que los tratamientos que presentaron menor contenido de calcio, tuvieron mayor incidencia de la enfermedad. Como lo demostraron Elad *et al.* (1993), el contenido de calcio en la planta le proporciona una menor susceptibilidad a *Botrytis cinerea*.

Lo que se pudo apreciar es que existe un efecto de los nutrientes sobre la incidencia de la enfermedad. (Ver gráfica 28) Los tratamientos que presentaban mayores dosis de fertilizante tuvieron mayor ataque, sin embargo no se pudo comprobar que alguno de los tres macronutrientes agregados (N P K) tuviese un mayor efecto. Como lo expresan Zimand *et al.* (1996), *Botrytis* necesita de nutrientes exógenos para su desarrollo los cuales serían suministrados por la fertilización.

Otra razón para este mayor ataque es que las plantas más nutridas están menos rustificadas, siendo más susceptibles al ataque del patógeno. Aunque no

hay grandes diferencias se pudo observar una tendencia con relación al contenido de calcio foliar y el nivel de incidencia.

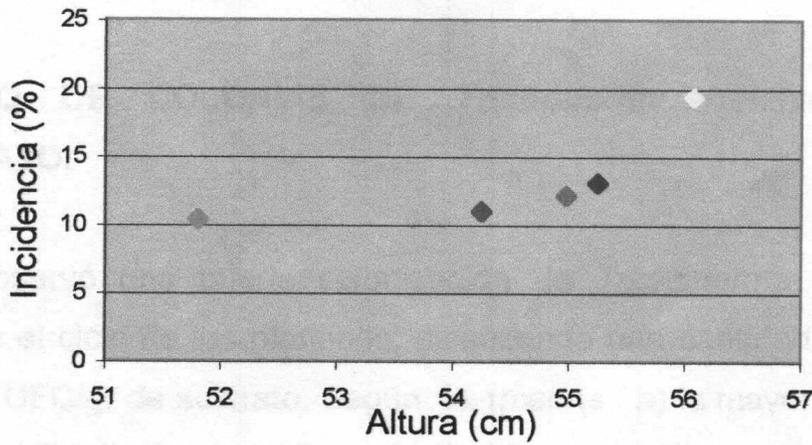
Los tratamientos que presentaron menor peso seco fueron los que exhibieron más síntomas de la presencia del patógeno (T3 y T5), sin embargo en el tratamiento 1 la incidencia de la enfermedad fue menor, a pesar de presentar un bajo peso seco, este efecto podría estar contrarrestado por la menor altura de los plantines, lo cual estaría relacionado con la incidencia de la enfermedad. Como se puede ver en la gráfica N° 27 los tratamientos que presentaron mayor altura fueron los más afectados por *Botrytis cinerea*. La interrelación de los parámetros morfológicos peso*altura deberían estandarizarse a los efectos de predeterminedar la incidencia de *Botrytis*.

Si se observa la gráfica en la que se muestra el desarrollo de la enfermedad (Gráfica N° 6), se puede apreciar que luego de la aplicación foliar de *Trichoderma harzianum* junto con el producto químico, se logra controlar al patógeno. A pesar de ello, la incidencia de *Botrytis cinerea* vuelve a subir hacia el final del ciclo productivo, aunque en este caso se puede apreciar una pendiente menor en la curva de desarrollo, esto podría deberse a los mecanismos de control que desarrolla *Trichoderma* en el filoplano y dentro de estos el que cita Zimand *et al.* (1996) para el patógeno evaluado, sería la competencia por nutrientes y espacio, aunque no se descartan otros mecanismos de acción como ser el micoparasitismo y la desactivación de enzimas del patógeno. Para confirmar lo antes mencionado estudios más específicos deberían llevarse a cabo.

A pesar de no encontrarse diferencias significativas para la incidencia de la enfermedad, entre los tratamientos 1 y 2, se pudo detectar en el testigo la presencia de *Trichoderma spp.* (no inoculado), Esto es debido a que el sustrato

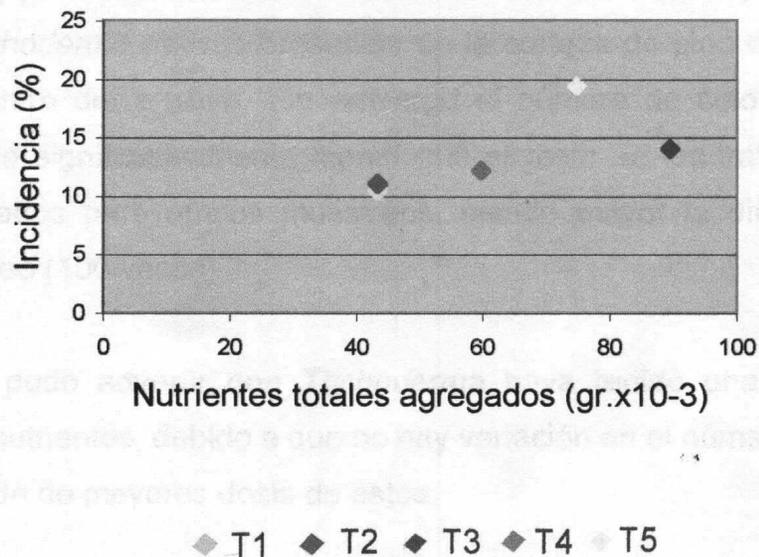
está compuesto por corteza de pino compostada, hecho que podría estar enmascarando los resultados del ensayo ya que las cepas encontradas en el testigo podrían ser más eficientes en el control de la enfermedad, lo cual se recomienda que sea motivo de futuras investigaciones. Se podría decir que *Trichoderma harzianum* efectuó un control de la enfermedad en todo el ensayo y se piensa que el mecanismo que estaría actuando, de acuerdo a la forma de inclusión de *Trichoderma* al Sistema sustrato-plantín (al sustrato), sería el de inducción de resistencia como menciona De Meyer *et al.* (1998). No obstante esta sugerencia debería ser confirmada por estudios específicos.

Gráfica N° 27: Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* según la altura de los plantines.



◆ T1 ◆ T2 ◆ T3 ◆ T4 ◆ T5

Gráfica N° 28: Incidencia según los nutrientes agregados (N P K)



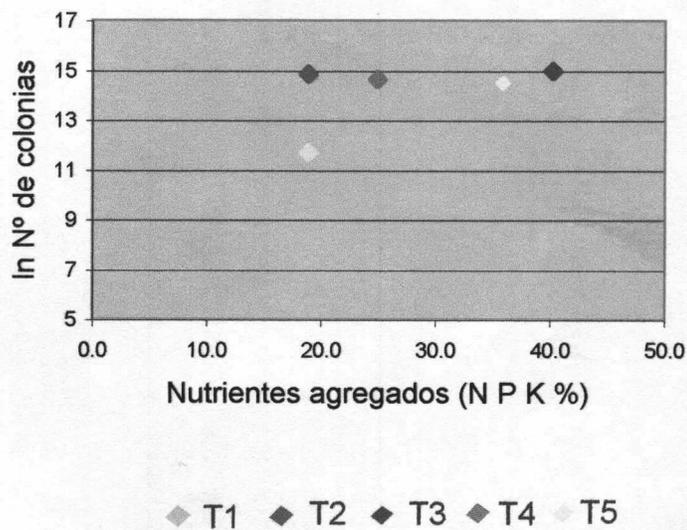
6.3 CONTEO DE COLONIAS DE *Trichoderma harzianum* EN EL SUSTRATO.

Se observó una buena colonización de *Trichoderma* en el sustrato durante todo el ciclo de los plantines, alcanzando una cantidad final promedio de 1.7×10^6 UFC/gr de sustrato. Según Harman (s.f b) la mayoría de las cepas pierden la habilidad de persistir en el sustrato por mucho tiempo, aunque hay evidencia de cepas que pueden permanecer por más de 18 meses. Lo anteriormente mencionado se pudo comprobar, ya que si se compara el número de colonias entre el primer y el segundo muestreo, éste disminuyó un 3% en promedio, no siendo importante dicha disminución.

Se pudo comprobar la presencia de *Trichoderma* en todos los tratamientos, para los dos momentos evaluados. Para el caso del tratamiento 1 (no inoculado) podría deberse a una contaminación del sustrato, ya sea por las cepas de *Trichoderma* nativas presentes en la corteza de pino o por la propia dispersión dentro del ensayo. Sin embargo el número de colonias de dicho tratamiento fue significativamente menor que el resto de los tratamientos que fueron inoculados para ambos muestreos, siendo mayor la diferencia en el primer muestreo (100 veces).

No se pudo advertir que *Trichoderma* haya tenido una respuesta al agregado de nutrientes, debido a que no hay variación en el número de colonias por el agregado de mayores dosis de estos.

Gráfica N° 29: Variación del número de colonias según los macronutrientes agregados.



Se pudo observar que *Trichoderma* no afecta la disponibilidad de nutrientes para la planta, ya que los valores de la relación carbono/nitrógeno no

varian significativamente entre los tratamientos inoculados y el no inoculado. Se aprecia una leve disminución en el contenido de nitrógeno y micronutrientes en el sustrato del tratamiento 2 con respecto al sustrato no inoculado, esto podría deberse a lo expresado por Kubicek and Harman (1998), donde se mencionan los requerimientos de carbono, nitrógeno y micronutrientes por parte de *Trichoderma*. EL hecho de no haberse observado diferencias significativas entre los tratamientos para los nutrientes mencionados, puede deberse a que los resultados pueden estar enmascarados por la contaminación del tratamiento 1 por *Trichoderma*.

7. CONCLUSIÓN

Se evaluó la respuesta de diferentes regímenes de fertilización y la inclusión de *Trichoderma harzianum* en el Sistema sustrato-planta de un vivero de *Eucalyptus grandis*, midiéndose parámetros de calidad de plantín, morfológicos y fisiológicos, aspectos nutricionales y sanitarios; también se evaluó la dinámica de *Trichoderma* en el sustrato a lo largo del ciclo del cultivo.

De los datos recogidos y del análisis de los mismos se concluye:

- 1- La inclusión de *Trichoderma harzianum* en el sustrato tuvo un efecto promotor de crecimiento expresado tanto en los parámetros de altura, diámetro como de peso seco de los plantines, alcanzando antes los estándares de calidad, traduciéndose en una menor permanencia en el vivero.
- 2- No se observaron respuestas significativas a la adición de dosis más altas de nutrientes que justifique un beneficio concreto, lo cual puede ir en detrimento de la calidad de planta por provocar desbalances nutricionales y cambios morfológicos.
- 3- *Trichoderma* colonizó y sobrevivió en el sustrato durante todo el ciclo del cultivo en niveles aproximados de $1,7 \times 10^6$ UFC/gr de sustrato. No se pudo comprobar un efecto inmovilizador de nutrientes con los regímenes de fertilización propuestos.
- 4- La incidencia de *Botrytis cinerea* fue menor en aquellos tratamientos con bajos niveles de fertilización. Se recomiendan dosis de nutrientes

balanceadas, ya que un desbalance nutricional favorece el incremento en el número de plantas con síntomas de enfermedad.

- 5- Con una única aplicación del fungicida químico se consiguió el control de la enfermedad en todo el ciclo del cultivo, por lo tanto se recomienda un manejo integrado de *Botrytis cinerea* en viveros forestales mediante la inclusión de *Trichoderma harzianum*.

8. RESUMEN

La inclusión de un agente de biocontrol en el sistema de producción comercial de plantines forestales, no ha sido estudiada en profundidad por lo que no se encuentran antecedentes nacionales o internacionales que informen sobre la dinámica del antagonista dentro del Sistema sustrato-plantín.

El ensayo se instaló en el vivero Buena Unión con *Eucalyptus grandis* sembrado en sustrato comercial mezcla de diferentes componentes orgánicos, esterilizado e inoculado con una cepa de *Trichoderma harzianum* de comprobado poder antagonista contra patógenos del suelo en general y de *Botrytis cinerea* en particular. Este hongo provoca importantes pérdidas de plantines y los productos químicos no son totalmente efectivos.

Los plantines recibieron diferentes dosis de N P K administradas en tres momentos del ciclo, arranque, cría y terminación. Estos permanecieron cinco meses en el vivero. El testigo (T1) recibió un nivel básico de fertilización y a diferencia de T2, el sustrato no fue inoculado con el antagonista. En T3, T4 y T5 el sustrato correspondiente estuvo inoculado con *Trichoderma* y las variantes fueron las dosis de fertilización en cada etapa del ciclo productivo. Se evaluaron parámetros morfológicos, fisiológicos, sanidad de los plantines y la dinámica de *Trichoderma* en el sustrato.

La inclusión de *Trichoderma harzianum* en el sustrato tuvo un efecto promotor en el crecimiento expresado tanto en altura, diámetro como en el peso seco de los plantines y se alcanzaron antes los estándares de calidad establecidos para la especie en estudio. No se observaron respuestas significativas a la adición de dosis más altas de nutrientes que justifiquen un

beneficio concreto. *Trichoderma* sobrevivió en el sustrato estudiado durante todo el ciclo del cultivo en niveles aproximados de $1,7 \times 10^6$ UFC/gr. de sustrato. No se pudo comprobar efecto inmovilizador de nutrientes en ningún tratamiento de fertilización. La incidencia de *Botrytis* fue del 20% en el tratamiento 5, la más alta de todos los tratamientos, siendo un 11% aproximadamente el valor más bajo. Las dosis más bajas de fertilización contribuyeron al mejor balance y a la menor incidencia del patógeno. Con una sola aplicación del fungicida químico se consiguió frenar el ataque de *Botrytis*.

Se discuten los resultados con la finalidad de establecer las pautas de manejo a la luz de la información nutricional y sanitaria de los plantines, conjuntamente con la dinámica del agente de biocontrol en el sustrato. En vista de estos resultados se sugiere la continuación de estos estudios para ajustar dichas pautas para el control integrado de la sanidad de plantines en vivero.

9. SUMMARY

The inclusion of agent of biocontrol in the system of plantines forest, has not been studied in depth reason why are not national or international antecedents that they inform on dynamics into the antagonist within the system substrate-plantin.

The test settled in the Buena Union breeding ground with *Eucalyptus grandis* seeded in commercial substrate mixture of different organic components, sterilized and inoculated with *Trichoderma harzianum* of verified to be able antagonistic against pathogens of the ground in general and of *Botrytis cinerea* in individual. This fungus causes important losses of plantines and the chemical agents are not totally effective.

Plantines received different doses from N P K administered at three moments of the cycle: starting, raises and completion. These remained five months in the breeding ground, the witness (T1) received a basic level of fertilization and unlike (T2) the substrate noinoculated with the antagonist, in T3, T4 and T5 the corresponding substrate was inoculated with *Trichoderma* and variants were the doses of fertilization in each stage of the productive cycle. Morphologic, physiological parameters, health of plantines and the dynamics of *Trichoderma* in the substrate were evaluated.

The inclusion of *Trichoderma harzianum* in the substrate had a promotional effect in the growth, expressed so much in height, diameter, as in the dry weight and plantines and the established standards of quality were reached before after the species in study. Significant answers were not

observed the addition of higher doses of nutrients than they justify a concrete benefit.

Trichoderma survived in the substrate studied throughout the cycle of the culture in levels approximated of $1,7 \times 10^6$ UFC/gr. by gram of verified. Inmovilizador effect of nutrients in any treatment of fertilization could not be verified. The incidence of *Botrytis* was of 20% in treatment 5, the highest of all the treatments, being approximately a 11% lowest value. The lowest doses of fertilization contributed to the best balance of nutrients and the smaller incidence of the pathogen. With a single application of chemical fungicide one was able to stop attack of *Botrytis*.

The results with the purpose are discussed of establishing guideline of handling by means of the nutritional and sanitary information of plantines, jointly with the dynamics of the agent of biocontrol en the substrate. In view of the theses results the continuation of these studies is suggested to fit these guidelines for the integrated control of the health of plantines in breeding ground.

10. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G.N. 1995. Fitopatología. 2ª edición. Limusa, México. 838 pp.

AHMAD, J. S. and BAKER, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 77:182-189.

ALTOMARE, C., BJÖRKMAN, T., NORVELL, W. and HARMAN, G. E. 1996. Solubilization of manganese dioxide by the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* 1295-22".

<<http://www.nysaes.cornell.edu/hort/faculty/bjorkman/other/abstracts/IUMS96.html>>.

ALTOMARE, C., NORVELL, W. A., BJÖRKMAN, T., and HARMAN, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Env. Microbiol. 65:2926-2933.

ANDREWS, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology. 30: 603-635 pp.

ARCIA, A. M. 1995. Uso de Antagonistas en el Control de Fitopatógenos del Suelo In Curso sobre Control Microbial de Insectos Plagas y Enfermedades en Cultivos. Trabajo Mimografiado, presentado en seminario en la Universidad Centro Occidental (UCLA). Barquisimeto - Venezuela. 20 p.

BACKMAN, P. and RODRIGUEZ, P. 1975. A system for the growth and delivery of biological control agents to the soil. Phytopathology 65(7):819-821.

BAKER, R. and COOK, R. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco USA, W. H. Freeman, 433 p.

BETUCCI, L., ALONZO, R., and FERNÁNDEZ, L. M. 1997. A comparative study of fungal populations in healthy and symptomatic twigs and seedlings of *Eucalyptus globulus* in Uruguay. *Sydowia*. 49 (2): 109-117.

BISSETT, J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69: 2373- 2417.

BJÖRKMAN, T. (s. f.) *Trichoderma* for control of soil pathogens. UCONN Department of Horticultural Sciences, Cornell University, Geneva, NY 14456.

www.hort.uconn.edu/ipm

BJÖRKMAN, T., BLANCHARD, L. and HARMAN, G. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of environmental stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123 (1): in press.

http://www.nysaes.cornell.edu/hort/faculty/bjorkman/bjorkman_pubs.html

BJÖRKMAN, T., BLANCHARD, L., and HARMAN, G. (s. f.) The effect of rhizosphere competence on colonization of sweet corn roots by biocontrol fungi in differing soils. Cornell University. Department of Horticultural Sciences, New York State Agricultural Experiment Station. Geneva, NY 14456-0462.

ABSTRACT.

http://www.nysaes.cornell.edu/hort/faculty/bjorkman/bjorkman_pubs.html

BJÖRKMAN, T., HARMAN, G., and BLANCHARD, L. 1995. Root development in sweet-corn inoculated with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Department of Horticultural Sciences, NYSAES, Cornell University.
<http://www.nysaes.cornell.edu/hort/faculty/bjorkman/other/abstracts/IUMS96.htm>

BLAKEMAN, J. and FOKKEMA, N. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192

BOFF, PEDRO. 2001. Epidemiology and biological control of grey mould in annual strawberry crops. Tesis PhD. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

BOVEY, R. 1984. La defensa de las plantas cultivadas. Ed. Omega. Barcelona, España. 897 p.

BRANTS, G. A. and EARLE, E.D. (s. f.). Transformation of Tobacco and Tomato with a Fungal Endochitinase. Department of Plant Breeding and Biometry, Cornell University, Ithaca, New York. www.ccfb.cornell.edu

CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Great Britain. Cambridge university press. 281p

CAZZOLINO, D. 1997. Determinación de materia seca con horno de microondas. INIA.

CHANG, Y.-C., BAKER, R., KLEIFELD, O., CHET, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145-148

CHAO, W.L., NELSON, E.B., HARMAN, G.E., HOCH, H.C. 1986. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology* 76: 60-65

COHEN, S., LEWIS, A., PAPAVIDAS, G. and BEAN, G. 1983. Cytological investigations of chlamydosporas of *Trichoderma* spp. (Abstracts). *Phytopathology*. 73(6):965.

COPPOLA, F. M., MENDOZA, G.N. Y REGULES, H. P. 2000. Caracterización de plantines de *Eucalyptus* y *Pinus* desde el punto de vista de la calidad en el Uruguay. Tesis, Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. 105p

DALLA-TEA, F. and MARCÓ M. A. 1996. Fertilizers and Eucalypt plantations in Argentina. In Attiwill, P. M. and Adams, M. A. ed. Nitrition of Eucalypts. Australia. CSIRO. pp 327-333

DANIELSON, R.M. and DAVEY, C.B. 1973a. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biology & Biochemistry* 5(5): 505-515.

DANIELSON, R.M. and DAVEY, C.B. 1973b. Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology & Biochemistry* 5(5): 495-504.

DANIELSON, R.M. and DAVEY, C.B. 1973c. The abundance of *Trichoderma* propágulos and the distribution of especies in forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 5 (5): 485-494 pp.

DE ARAUJO, J. G. 1995. Produção e controle de qualidade de mudas forestais. Ed. Folha de Visçosa, Curitiba, Brasil. 451 p.

DE LA CRUZ, J., PINTOR-TORO, J. A., BENÍTEZ, T. Y LLOVELL, A. 1995. Purification and characterization of an Endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. Journal of Bacteriology. 177 (7): 1864-1871.

DELL, B. Diagnosis of nutrient deficiencies in Eucalypts. In Attiwill, P. M. and Adams, M. A. ed. Nutrition of Eucalypts. Australia. CSIRO. pp 417-440

DONALD, D., JACOBS, C. and MILANI, M. 1992. Comparison between a commercial fertilizer prescription and soluble and granular forms of 2:3:2 and 3:2:1 with and without trace elements as applied to *Eucalyptus grandis* seedlings. South African Forestry Journal, 161:27-29.

EDEN, M.A., HILL, R.A., STEWART, A. 1996. Biological control of *Botrytis* stem infection of greenhouse tomatoes. Plant Pathology 45: 276-284.

ELAD, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protection, 19: 709-714.

ELAD, Y., EVENSEN, K. 1995. Physiological Aspects of Resistance to *Botrytis cinerea*. Phytopathology 85: 637-643

ELAD, Y., KÖHL, J. and FOKKEMA, N. J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. European journal plant pathology. 100:315-336.

ELAD, Y., YUNIS, H., VOLPIN, H. 1993. Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant, and pepper crops to *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Botany 71: 602-608

ELLIS, M. A. (s. f.) *Botrytis* Fruit Rot "Gray Mold" of Strawberry, Raspberry and Blackberry. Ohio State University Extension Fact Sheet Plant Pathology 2021 Coffey Road, Columbus, Ohio 43210-1087. www.ohioline.osu.edu

ESPOSITO, E., DA SILVA, M., 1998. Systematic and Environmental application of the genus *Trichoderma*. Critical reviews in microbiology 24(2): 89-98.

FERNANDEZ-LARREDA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. Costa Rica. N° 62. pp 96-100.

HARAN, S., SCHICKLER, H., OPPENHEIM, A., CHET, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology 86: 980-985

HARMAN, G. 1996. *Trichoderma* for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to Commercialized Products. Departments of Horticultural Science and of Plant Pathology. Cornell University NYSAES Geneva, NY 14456
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.html>

HARMAN, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84 (4): 377-393

HARMAN, G. (s. f.a) *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). Cornell University, Geneva, NY 14456.

<http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/trichoderma.html>

HARMAN, G. (s. f.b) *Trichoderma spp.*, including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system) (Ascomycetes, Hypocreales, usually *Hypocrea spp.*, are sexual anamorphs, this life stage is lacking or unknown for biocontrol strains) Cornell University, Geneva, NY 14456.
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/toc.html>

INBAR, J., ABRAMSKY, D., COHEN, D., CHET, I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *European Journal of Plant Pathology* 100: 337-346

IRISITY, F. 1999. El vivero forestal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. 26 p.

JARVIS, W. R. 1989. Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Diseases* Vol. 73 N° 3 190-194.

JONES, C. 1988. Nutrición mineral. Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de producción vegetal, Cátedra de fisiología vegetal. Montevideo, Uruguay.

JUDD, T. S, ATTIWILL, P. M. and ADAMS, M. A. 1996. Nutrient concentrations in *Eucalyptus*: A synthesis in relation to differences between taxa, sites and components. In Attiwill, P. M. and Adams, M. A. ed. *Nutrition of Eucalypts*. Australia. CSIRO. pp 123-153.

KNUDSEN, G. and BIN, L. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from Alginate pellets. *Phytopathology* 80(8):724-727.

KUBICEK, C. P. and HARMAN, G. E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volumen 1. Editorial Taylor & Francis Ltd., London, England. 278 p.

LARENAS, C. y MONTEALEGRE, J. 1995. Efecto de la temperatura de almacenaje y del contenido de nutrientes sobre la viabilidad de pellets de *Trichoderma harzianum*. *Fitopatología* 31(1):66-69.

LEWIS, J.A. and PAPAVIDAS, G.C. 1984. Chlamyospore formation by *Trichoderma spp.* in natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology* 30:1-7

LO, C.; NELSON, E. and HARMAN, G. E. 1997. Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. *Plant Disease* 81(10):1132-1138.

LO, C.; NELSON, E., HAYES, C. and HARMAN, G. E. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88:129-136.

Mc EDEN, W. E. 1973. Mode of penetration of epidermal cells walls of *Vicia fava* by *Botrytis Cinerea*. *Phytopathology* 64:461-467.

MODERNEL, R. 1998. Guía uruguaya para la protección y fertilización vegetal. Editorial agropecuario Hemisferio Sur SRL Montevideo Uruguay.

MÓNACO, C. 1990. Incremento en el crecimiento de las plantas inducido por *Trichoderma harzianum* y *T. koningii*. Revista de la Facultad de Agronomía. 66/67: 75-77

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1978. Desarrollo y control de las enfermedades de las plantas. Limusa. México. Vol 1. 223 p.

NICHOLLS, C. I., ALTIERI, M. A. Bases agroecológicas para el manejo de la biodiversidad en agroecosistemas: efectos sobre plagas y enfermedades. Division of Biological Control, University of California, Berkeley, USA. www.agroeco.org

O'NEILL, T.M., HTIENBERG, D.S., ELAD, Y. 1997. Effect of some host and microclimate factors o infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 81(1):36-39

ORECCHIA, S., GEPP, V., GAMBA, F. 1992. Hongos fitopatógenos. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. Cátedra de fitopatología, Montevideo, Uruguay. 39 p.

PAPAVIZAS, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54

PEZET, P., PONT, V., TABACCHI, R, 1999. Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma spp*, usuful for testig the antagonistic activity of these fungi. Phytochemical analysis 10: 285-288.

RABEENDRAN, N., MOOT, D., JONES, E. and STEWART, A. 2000. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. *New Zealand Plant Protection*. 53:143-146.

REYNA, R. G. 2000. Evaluación de métodos biológicos y químicos para el control de *Botrytis cinerea* en viveros de *Eucalyptus globulus*. Tesis. Universidad de la republica, Facultad de Agronomía, Montevideo Uruguay. 70p

RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ, R., VEGA, G. Y RUIZ, A. D. 1993. Técnicas de cultivo de planta en envase suspendido. Congreso Forestal Español. Ponencias y Comunicaciones. Tomo II. (Falta páginas)

ROMERO, G. 1995. Enfermedades de *Eucalyptus* en Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. 7p.

SANFUENTES, E., STOWASSER, V., ALVES, F. 1997. Avaliação de fungos para o biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiro suspensos de Eucalipto. *Rev. Árv. Viscos- MG*, V21.n1, pp.147-153.

SUTON, J. and PENG, G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit disease in cropping systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:473-493.

VERO, S. y MONDINO, P. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. www.fagro.edu.uy/fitopato/web

VILLEGAS, B y CASTAÑO, J. (s. f.). Identificación de aislamientos promisorios de *Trichoderma spp.* para el control de *Phytophthora cactorum* (Lembert &

Cohn) Schrbeter, causante de la pudrición de la corona y raíz del del manzano (Malus domestica Borkh) en caldas. <http://ciagrope.tripod.com/fitote32.html>

VON WERNICH, M. LAVADO, R. Y PORCELLI, C. (s. f.) Preparando los plantines. <http://www.fertilizar.org.ar/articulos/PreparandolosPlantines.htm>

WILLIAMSON, B. and Mc NICOL, R.J. 1986. Pathways of infection of flowers and fruits of red raspberry by *Botrytis cinerea*. Acta Hort. 183: 137-141

WINDHAM, M. T., ELAD, Y. and BAKER, R., 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp.* Phytopathology 76: 518-521.

ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea*. Pathogenicity. Phytopathology 86: 1255-1260

11. ANEXOS

ANEXO 1

Parámetros morfológicos

Altura y Diámetro a la altura del cuello

Cuadro N° 1: *Datos de altura y diámetro a la altura del cuello el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Primer muestreo		Segundo muestreo	
	Altura	Diámetro	Altura	Diámetro
T1	18.6	1.7	51.2	3.1
T1	15.5	1.6	50.0	2.9
T1	16.7	1.6	55.4	3
T1	17.2	1.8	50.6	3
T2	20.1	2	56.1	3.3
T2	18.4	2	52.7	2.8
T2	18.3	1.8	54.4	3
T2	19.8	1.9	53.8	3.2
T3	24.8	1.7	56.7	4.1
T3	19.1	1.8	55.0	3.3
T3	18.2	1.7	53.2	3.1
T3	21.6	1.7	56.1	3.3
T4	20.1	1.8	54.4	3.1
T4	19.1	1.8	52	3.0
T4	20.1	1.7	60.3	3
T4	19.1	1.6	53.2	3
T5	19.9	1.9	57.8	2.9
T5	18.2	1.6	54.2	3.2
T5	18.2	1.8	53.5	3.1
T5	19.2	1.8	58.8	3.1

Cuadro N° 2: *Análisis de varianza para la altura en el primer muestreo.*

F de V	G L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	32.17300	8.043250	3.27	0.0406
Error	15	36.84500	2.456333		
Total	19	69.01800			

C.V: 8.201305 Media: 19.11000

Cuadro N° 3: *Análisis de varianza para la altura en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	42.46700	10.61675000	1.72	0.1970
Error	15	92.37500	6.15833333		
Total	19	134.84200			

C.V: 4.555900 Media: 54.47000

Cuadro N° 4: *Análisis de varianza para el diámetro a la altura del cuello en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.14800	0.037000	4.04	0.0204
Error	15	0.13750	0.009167		
Total	19	0.28550			

C.V: 5.424516 Media: 1.765000

Cuadro N° 5: *Análisis de varianza para el diámetro a la altura del cuello en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.55800	0.13950	2.66	0.0740
Error	15	0.78750	0.05250		
Total	19	1.34550			

C.V: 7.308733 Media: 3.135000

Peso seco de la parte aérea y de raíz

Cuadro N° 6: *Datos para peso seco foliar y peso seco de raíz en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Primer muestreo		Segundo muestreo	
	Peso seco foliar	Peso seco raíz	Peso seco foliar	Peso seco raíz
T1	25	16	24	12
T1	21	12	21	13
T1	25	16	25	16
T1	21	16	28	13
T2	25	17	31	16
T2	23	17	26	13
T2	23	15	26	12
T2	22	12	43	11
T3	21	21	24	15
T3	20	12	30	12
T3	23	18	21	11
T3	19	11	24	14
T4	23	13	47	13
T4	23	10	30	12
T4	19	12	26	12
T4	18	11	29	10
T5	21	14	30	17
T5	25	22	27	13
T5	20	14	25	14
T5	23	10	29	13

Cuadro N° 7: *Análisis de varianza para el peso seco aéreo en el primero muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	23.00000	5.75000	1.33	0.3052
Error	15	65.00000	4.33333		
Total	19	88.00000			

C.V. 9.462118 Media: 22.000

Cuadro N° 8: *Análisis de varianza para el peso seco aéreo en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	238.700	59.6750	1.64	0.2158
Error	15	545.500	36.3667		
Total	19	784.200			
C.V.: 23.88964		Media: 14.450			

Cuadro N° 9: *Análisis de varianza para el peso seco de la raíz en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	44.20000	11.05000	0.93	0.4742
Error	15	178.75000	11.91667		
Total	19	222.95000			
C.V.: 23.88964		Media: 14.4500			

Cuadro N° 10: *Análisis de varianza para el peso seco de la raíz en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	13.300	3.3250	1.03	0.4246
Error	15	48.500	3.2333		
Total	19	61.800			
C.V.: 13.72631		Media: 13.1000			

ANEXOS 2

Incidencia de la enfermedad causada por Botrytis cinerea

Cuadro N° 11: *Datos para la incidencia de la enfermedad causada por Botrytis en Eucalyptus grandis.*

Tratamientos	N° de plantas enfermas	Porcentaje
T1	40	13.89
T1	33	11.46
T1	24	8.33
T1	23	7.99
T2	24	8.33
T2	34	11.81
T2	35	12.15
T2	34	11.81
T3	36	12.50
T3	56	19.44
T3	32	11.11
T3	27	9.38
T4	27	9.38
T4	35	12.15
T4	45	15.63
T4	33	11.46
T5	61	21.18
T5	60	20.83
T5	36	12.50
T5	66	22.92

Cuadro N° 12: *Análisis de varianza para la incidencia de Botrytis en plantines de Eucalyptus grandis.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	205.95015	51.48753	4.36	0.0154
Error	15	176.97622	11.79841		
Total	19	382.9263			

C.V.: 25.99722 Media: 13.21250

ANEXO 3

Análisis foliar

Macronutrientes

Cuadro N° 13: *Contenidos de macronutrientes foliar en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Primer muestreo					Segundo muestreo				
	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	N %	P %	K %	Ca %	Mg %
T1	3.82	0.25	1.71	0.38	0.18	2.75	0.33	2.23	0.84	0.41
T1	3.75	0.24	1.71	0.34	0.19	3.21	0.36	2.17	0.79	0.40
T1	3.70	0.25	1.62	0.35	0.18	3.13	0.35	2.02	0.78	0.41
T1	3.49	0.24	1.56	0.29	0.18	2.88	0.28	1.97	0.80	0.42
T2	3.65	0.26	1.76	0.37	0.20	2.71	0.27	1.89	0.76	0.40
T2	3.69	0.25	1.61	0.33	0.19	3.32	0.38	2.00	0.84	0.45
T2	3.67	0.25	1.73	0.35	0.19	3.23	0.33	1.97	0.78	0.43
T2	3.70	0.26	1.77	0.34	0.20	2.84	0.28	1.82	0.69	0.38
T3	4.35	0.29	1.88	0.33	0.20	3.23	0.29	1.79	0.73	0.42
T3	4.09	0.30	1.76	0.33	0.18	3.50	0.34	2.13	0.69	0.41
T3	4.23	0.28	1.75	0.35	0.18	3.74	0.35	2.20	0.67	0.41
T3	4.46	0.30	1.88	0.34	0.19	3.20	0.35	2.08	0.70	0.42
T4	3.89	0.26	1.73	0.33	0.20	3.16	0.34	1.88	0.81	0.43
T4	3.72	0.25	1.80	0.31	0.18	3.32	0.38	2.14	0.80	0.42
T4	4.12	0.29	1.81	0.34	0.20	2.96	0.35	2.16	0.79	0.42
T4	3.89	0.26	1.79	0.35	0.19	3.24	0.36	2.32	0.75	0.38
T5	4.01	0.31	1.80	0.36	0.20	2.94	0.30	2.00	0.76	0.44
T5	3.83	0.28	1.64	0.33	0.19	3.16	0.35	2.22	0.75	0.41
T5	3.78	0.26	1.57	0.30	0.18	3.23	0.31	1.95	0.65	0.40
T5	3.67	0.27	1.65	0.33	0.19	3.20	0.30	1.85	0.73	0.43

Cuadro N° 14: *Análisis de varianza para el contenido de nitrógeno en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.971770	0.2429425	13.06	0.0001
Error	15	0.279125	0.0186083		
Total	19	1.250895			
C.V. 3.519865		Media 3.8755			

Cuadro N° 15: *Análisis de varianza para el contenido de nitrógeno en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.450650	0.1126625	2.36	0.1004
Error	15	0.716925	0.047795		
Total	19	1.167575			
C.V.: 6.945852		Media: 3.147500			

Cuadro N° 16: *Análisis de varianza para el contenido de fósforo en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.005800	0.001450	7.84	0.0013
Error	15	0.002775	0.000185		
Total	19	0.008575			
C.V. 5.084662		Media: 0.267500			

Cuadro N° 17: *Análisis de varianza para el contenido de fósforo en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00485	0.0012125	1.10	0.3928
Error	15	0.01655	0.0011033		
Total	19	0.02140			
C.V.: 10.06559		Media: 0.330000			

Cuadro N° 18: *Análisis de varianza para el contenido de potasio en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.084530	0.02113250	3.96	0.0219
Error	15	0.080125	0.00534167		
Total	19	0.164655			
C.V.: 4.23329		Media: 1.726500			

Cuadro N° 19: *Análisis de varianza para el contenido de potasio en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.105020	0.026255	1.18	0.3610
Error	15	0.335075	0.022336		
Total	19	0.440095			
C.V.: 7.328274		Media: 2.039500			

Cuadro N° 20: *Análisis de varianza para el contenido de calcio en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.000750	0.000187	0.35	0.8397
Error	15	0.008025	0.000535		
Total	19	0.008775			
C.V.: 6.853353		Media: 0.8397			

Cuadro N° 21: *Análisis de varianza para el contenido de calcio en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.031320	0.007830	4.70	0.0117
Error	15	0.024975	0.001665		
Total	19	0.056295			
C.V.: 5.400981		Media: 0.755500			

Cuadro N° 22: *Análisis de varianza para el contenido de magnesio en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.000370	0.00009250	1.50	0.2520
Error	15	0.000925	0.00006167		
Total	19	0.001295			
C.V. 4.143964		Media: 0.189500			

Cuadro N° 23: *Análisis de varianza para el contenido de magnesio en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.000220	0.0000550	0.15	0.9623
Error	15	0.005675	0.0003783		
Total	19	0.005895			
C.V.: 4.692592		Media: 0.414500			

Micronutrientes

Cuadro N° 24: *contenido de micronutrientes en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Primer muestreo				Segundo muestreo			
	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
T1	340	637	10	25	207	1348	14	37
T1	266	713	10	28	127	1223	14	34
T1	216	550	8	23	106	1052	13	33
T1	482	504	8	22	111	1180	14	32
T2	219	635	9	27	103	1028	12	31
T2	298	638	8	27	115	1038	15	31
T2	181	682	9	27	192	1440	15	42
T2	274	663	10	28	90	876	12	27
T3	438	744	9	32	118	870	14	26
T3	381	523	8	25	141	1116	15	35
T3	340	637	10	25	115	928	15	33
T3	196	469	8	24	89	1028	13	28
T4	172	602	8	25	96	999	14	27
T4	203	632	11	27	101	1205	14	32
T4	197	657	8	28	82	1090	13	27
T4	318	582	7	23	108	1024	14	32
T5	185	641	8	31	103	1108	14	34
T5	271	586	8	24	87	1006	14	28
T5	400	569	9	26	102	1085	14	29
T5	214	556	9	25	74	1129	15	34

Cuadro N° 25: *Análisis de varianza para el contenido de hierro en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	32256.50	8064.125	0.97	0.4502
Error	15	124080.50	8272.033		
Total	19	156337.00			
C.V.: 31.96862		Media: 284.500			

Cuadro N° 26: *Análisis de varianza para el contenido de hierro en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	5959.30	1489.8250	1.47	0.2611
Error	15	15223.25	1014.8833		
Total	19	21182.55			
C.V.: 28.10519		Media: 113.35000			

Cuadro N° 27: *Análisis de varianza para el contenido de manganeso en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	11555.50	2888.875	0.54	0.7068
Error	15	79810.50	5320.700		
Total	19	91366.00			
C.V.: 11.93832		Media: 611.0000			

Cuadro N° 28: *Análisis de varianza para el contenido de manganeso en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	93524.80	23381.2000	1.21	0.3461
Error	15	289031.75	19268.7833		
Total	19	382556.55			
C.V.: 12.75084		Media: 1088.6500			

Cuadro N° 29: *Análisis de varianza para el contenido de cobre en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	1.00000	0.25000	0.20	0.9344
Error	15	18.75000	1.25000		
Total	19	19.75000			
C.V.: 12.77753		Media: 8.7500			

Cuadro N° 30: *Análisis de varianza para el contenido de cobre en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	1.8000	0.4500	0.48	0.7486
Error	15	14.0000	0.9333		
Total	19	15.8000			
C.V.: 6.950301		Media: 13.9000			

Cuadro N° 31: *Análisis de varianza para el contenido de zinc en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	17.30000	4.32500	0.61	0.6623
Error	15	106.50000	7.10000		
Total	19	123.80000			
C.V. 10.20913		Media: 26.10000			

Cuadro N° 32: *Análisis de varianza para el contenido de zinc en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	51.3000	12.8250	0.78	0.5570
Error	15	247.5000	16.5000		
Total	19	298.8000			
C.V.:12.85449		Media: 31.6000			

ANEXO 4

Análisis químico del sustrato en el primer y segundo muestreo

Macronutrientes

Cuadro N° 33: *Contenidos de macronutrientes en sustrato en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Primer muestreo							Segundo muestreo						
	C %	C/N	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	C %	C/N	N %	P %	K %	Ca %	Mg %
T1	29	36	0.8	0.15	0.078	0.39	0.06	28	39	0.15	0.050	0.30	0.07
T1	30	40	0.75	0.14	0.082	0.39	0.06	26	41	0,66	0.17	0.042	0.34	0.06
T1	28	38	0.73	0.14	0.091	0.39	0.06	29	39	0,70	0.16	0.042	0.34	0.06
T1	29	40	0.72	0.15	0.075	0.41	0.06	28	42	0,72	0.15	0.042	0.39	0.06
T2	32	48	0.67	0.13	0.082	0.40	0.06	30	37	0,72	0.16	0.039	0.33	0.06
T2	28	39	0.71	0.17	0.071	0.40	0.06	26	34	0,71	0.15	0.053	0.33	0.07
T2	30	42	0.72	0.16	0.08	0.39	0.06	26	37	0,76	0.16	0.048	0.34	0.07
T2	29	40	0.73	0.15	0.07	0.40	0.06	26	39	0,71	0.16	0.049	0.32	0.07
T3	31	42	0.71	0.15	0.081	0.37	0.06	29	34	0,75	0.17	0.046	0.33	0.06
T3	28	44	0.64	0.13	0.11	0.33	0.06	26	39	0,76	0.20	0.059	0.36	0.08
T3	32	47	0.68	0.13	0.076	0.43	0.06	29	41	0,74	0.20	0.054	0.33	0.07
T3	29	40	0.72	0.18	0.097	0.35	0.07	28	46	0,68	0.19	0.053	0.35	0.07
T4	30	41	0.74	0.15	0.098	0.32	0.06	32	46	0,70	0.16	0.046	0.33	0.07
T4	33	43	0.77	0.14	0.08	0.37	0.06	30	43	0,70	0.17	0.054	0.35	0.07
T4	31	32	0.96	0.13	0.072	0.33	0.05	34	46	0,73	0.17	0.052	0.35	0.07
T4	29	43	0.68	0.14	0.087	0.35	0.07	31	44	0,70	0.16	0.053	0.36	0.07
T5	27	38	0.76	0.13	0.097	0.35	0.06	29	38	0,76	0.18	0.040	0.33	0.07
T5	29	39	0.69	0.15	0.099	0.35	0.07	29	41	0,70	0.19	0.045	0.35	0.07
T5	29	40	0.72	0.14	0.072	0.33	0.05	27	38	0,70	0.18	0.053	0.31	0.07
T5	29	40	0.72	0.14	0.088	0.36	0.03	33	47	0,70	0.18	0.042	0.36	0.07

Cuadro N° 34: *Análisis de varianza para el contenido de carbono en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	12.30000	3.07500	1.42	0.2755
Error	15	32.50000	2.16667		
Total	19	44.80000			

C.V.: 4.972838 Media: 29.6000

Cuadro N° 35: *Análisis de varianza para el contenido de carbono en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	56.70000	14.1750	4.21	0.0176
Error	15	50.50000	3.36667		
Total	19	107.2000			
C.V.: 6.37100		Media: 28.8000			

Cuadro N° 36: *Análisis de varianza para la relación carbono/nitrógeno en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	66.80000	16.70000	1.46	0.2644
Error	15	172.0000	11.46667		
Total	19	238.8000			
C.V.: 8.340509		Media: 40.6000			

Cuadro N° 37: *Análisis de varianza para la relación carbono/nitrógeno en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	140.04769133	35.01192283	4.13	0.0204
Error	15	118.55823581	8.46844542		
Total	19	258.60592714			
C.V.: 7.210593		Media: 40.35811154			

Cuadro N° 38: *Análisis de varianza para el contenido de nitrógeno en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.02428	0.00607	1.62	0.2201
Error	15	0.05610	0.00374		
Total	19	0.08038			
C.V.: 8.366011		Media: 0.73100			

Cuadro N° 39: *Análisis de varianza para el contenido de nitrógeno en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00324649	0.00081162	1.05	0.4166
Error	15	0.01081667	0.00077262		
Total	19	0.1406316			
C.V.: 3.883268		Media: 0.71578947			

Cuadro N° 40: *Análisis de varianza para el contenido de fósforo en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00045	0.0001125	0.55	0.6998
Error	15	0.00305	0.0002033		
Total	19	0.00350			
C.V.: 9.834138		Media: 0.145000			

Cuadro N° 41: *Análisis de varianza para el contenido de fósforo en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.003570	0.0008925	11.90	0.0001
Error	15	0.001125	0.0000750		
Total	19	0.004695			
C.V.: 5.079328		Media: 0.17050			

Cuadro N° 42: *Análisis de varianza para el contenido de potasio en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00059170	0.00014793	1.23	0.3384
Error	15	0.00179850	0.00011990		
Total	19	0.00239020			
C.V.: 12.98919		Media: 0.0084300			

Cuadro N° 43: *Análisis de varianza para el contenido de potasio en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00024430	0.00006108	2.44	0.0922
Error	15	0.00037550	0.00002503		
Total	19	0.00061980			
C.V.: 10.40194		Media: 0.048100			

Cuadro N° 44: *Análisis de varianza para el contenido de calcio en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.010570	0.00264250	5.00	0.0092
Error	15	0.007925	0.00052833		
Total	19	0.018495			
C.V.: 6.203914		Media: 0.370500			

Cuadro N° 45: *Análisis de varianza para el contenido de calcio en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00213	0.0005325	1.84	0.1744
Error	15	0.00435	0.000290		
Total	19	0.00648			
C.V.: 4.950403		Media: 0.344000			

Cuadro N° 46: *Análisis de varianza para el contenido de magnesio en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.00023	0.0000575	0.75	0.5732
Error	15	0.00115	0.0000767		
Total	19	0.00138			
C.V.: 14.84059		Media: 0.059000			

Cuadro N° 47: *Análisis de varianza para el contenido de magnesio en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	0.000170	0.00004250	1.82	0.1772
Error	15	0.000350	0.00002333		
Total	19	0.000520			

C.V.: 7.103616 Media: 0.006800

Micronutrientes

Cuadro N° 48: *Contenidos de micronutrientes en sustrato en el primer y segundo muestreo.*

Tratamientos	Primer muestreo				Segundo muestreo			
	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm	Fe ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm
T1	12329	478	22	24	13373	395	20	34
T1	13758	531	24	26	12615	418	19	29
T1	11370	452	23	29	13508	402	20	27
T1	13267	509	23	28	12884	403	20	28
T2	11037	430	20	24	13625	456	23	30
T2	14267	527	22	31	12337	394	18	29
T2	13684	559	24	27	13300	454	21	32
T2	11259	449	20	25	13226	419	21	34
T3	11116	442	21	23	12921	415	23	28
T3	12761	468	26	32	13950	435	20	41
T3	14255	518	23	33	12681	365	19	32
T3	12063	545	27	38	12241	395	19	34
T4	14582	590	22	29	11700	407	22	35
T4	12079	579	23	31	14362	412	23	36
T4	13971	466	19	23	13627	419	21	35
T4	12745	578	24	32	11474	337	22	36
T5	12603	497	20	23	13346	402	22	35
T5	11874	539	24	29	14027	411	22	41
T5	13113	458	20	20	128856	384	20	35
T5	11985	533	24	31	11998	311	20	34

Cuadro N° 49: *Análisis de varianza para el contenido de cobre en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	19.20000	4.80000	1.10	0.3945
Error	15	65.75000	4.38333		
Total	19	84.95000			
C.V.:		9.284440	Media: 22.55000		

Cuadro N° 50: *Análisis de varianza para contenido de cobré en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	7.2000	1.8000	0.79	0.5471
Error	15	34.0000	2.2667		
Total	19	41.2000			
C.V.:		7.238199	Media: 20.8000		

Cuadro N° 51 *Análisis de varianza para el contenido de hierro en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	1022860.700	255715.175	0.17	0.9504
Error	15	22566696.250	1504446.417		
Total	19	23589556.950			
C.V.:		9.604664	Media: 12770.45		

Cuadro N° 52: *Análisis de varianza para el contenido de hierro en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	294242.70000	73560.6750	0.10	0.9816
Error	15	11288388.2499	752559.2166		
Total	19	11582630.950			
C.V.:		6.671781	Media: 13002.550		

Cuadro N° 53: *Análisis de varianza para el contenido de manganeso en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	11142.80	2785.700	1.16	0.3670
Error	15	36004.00	2400.267		
Total	19	47146.80			
C.V.:		9.655600	Media: 507.400		

Cuadro N° 54: *Análisis de varianza para el contenido de manganeso en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	6102.700	1525.6750	1.41	0.2769
Error	15	16175.500	1078.3666		
Total	19	22278.200			
C.V.:		8.174880	Media: 401.700		

Cuadro N° 55: *Análisis de varianza para el contenido de zinc en sustrato en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	83.80000	20.95000	1.09	0.3962
Error	15	288.00000	19.20000		
Total	19	371.80000			
C.V.: 15.70531		Media: 27.90000			

Cuadro N° 56: *Análisis de varianza para el contenido de zinc en sustrato en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	149.3000	37.3250	3.42	0.0353
Error	15	163.5000	10.9000		
Total	19	312.8000			
C.V.: 99.884775		Media: 33.4000			

ANEXO 5

Conteo de colonias de *Trichoderma*

Cuadro N° 57: *Número de colonias de Trichoderma harzianum en el primer y segundo muestreo*

Tratamientos	Primer muestreo	Segundo muestreo
	Número de colonias	Número de colonias
T1	6.22×10^4	1.4×10^5
T1	3.94×10^4	6.8×10^4
T1	3.96×10^4	9.8×10^4
T1	2.16×10^4	4.2×10^4
T2	2.23×10^6	1.6×10^6
T2	3.14×10^6	1.9×10^6
T2	3.13×10^6	9.3×10^6
T2	2.90×10^6	1.7×10^6
T3	2.43×10^6	3.9×10^6
T3	3.14×10^6	1.6×10^6
T3	3.25×10^6	1.3×10^6
T3	4.46×10^6	9.1×10^6
T4	1.45×10^6	1.7×10^6
T4	2.08×10^6	1.8×10^6
T4	4.75×10^6	1.9×10^6
T4	1.96×10^6	1.4×10^6
T5	1.42×10^6	2.1×10^6
T5	1.83×10^6	1.2×10^6
T5	2.25×10^6	2.2×10^6
T5	2.68×10^6	1.5×10^6

Cuadro N° 58: *Análisis de varianza para el número de colonias de Trichoderma harzianum en el primer muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	30.35990619	7.58997655	9.09	0.0006
Error	15	12.51886343	0.83459090		
Total	19	42.87876962			

C.V.: 6.461168 Media: 14.13923149

Cuadro N° 59: *Análisis de varianza para el número de colonias de Trichoderma harzianum en el segundo muestreo.*

F de V	G. L.	S. C.	C. M.	F	Pr > F
Tratamiento	4	29.29826092	7.32456523	43.05	0.0001
Error	15	2.55215736	0.17014382		
Total	19	31.85041828			
C.V.: 3.011423		Media: 13.69734243			

ANEXO 6

Foto N° 1: *Plantines de Eucalyptus grandis del ensayo con siete semanas de edad*

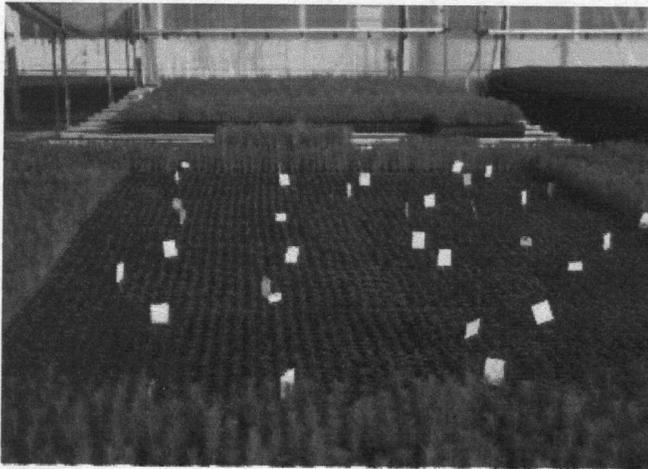


Foto N° 2: *Plantines de Eucalyptus grandis con siete semanas de edad*



Foto N° 3: *Cultivo de Tricoederma harzianum para el conteo de colonias*



Foto N° 4: *Placas con Tricoederma harzianum en el momento de fructificación*

Foto N° 4: *Colonias Trichoderma harzianum fructificación*



Foto N° 5: *Plantas muestreadas en el primer muestreo.*

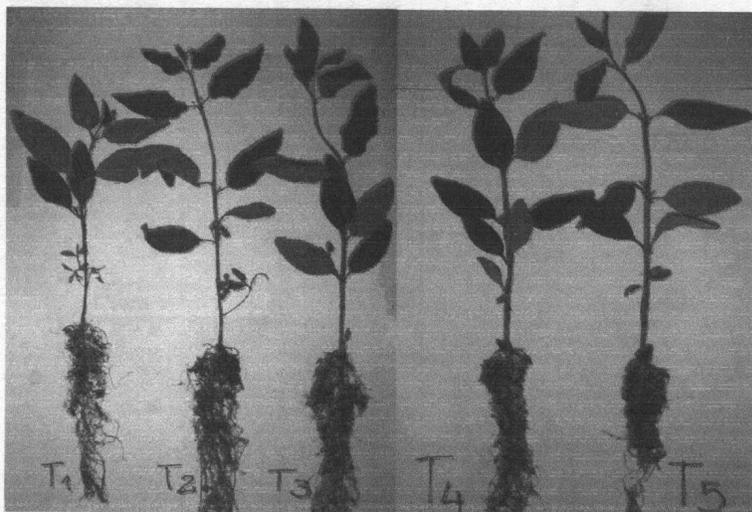


Foto N° 6: *Plantas muestreadas en el segundo muestreo.*

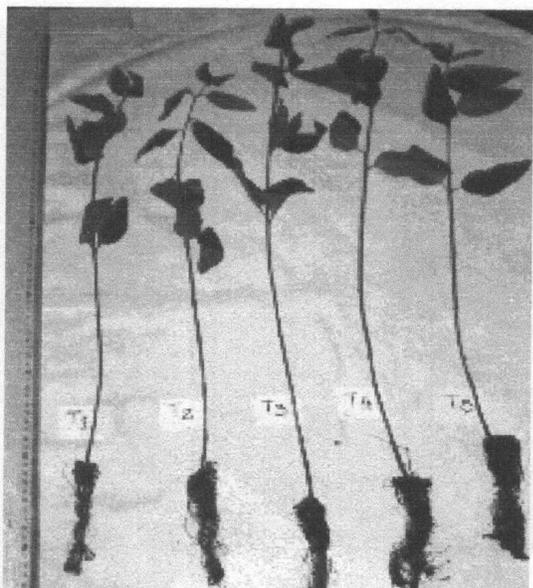


Foto N° 7: *Plantas con síntomas de la enfermedad causada por Botrytis cinerea.*

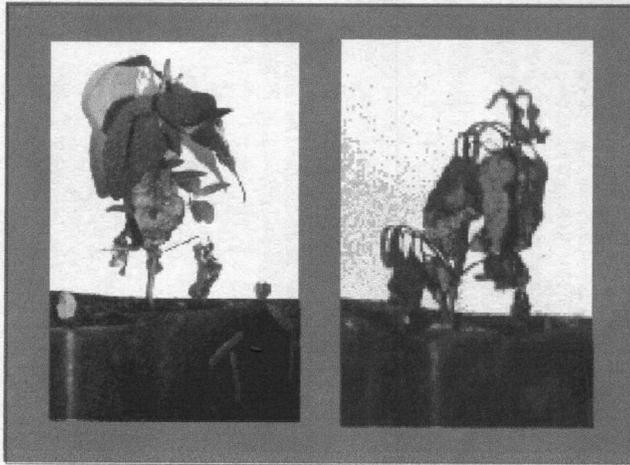


Foto N° 7: *Diferencias de coloración entre plantines con Trichoderma harzianum y fertilización con plantines sin fertilización en presencia y ausencia de Trichoderma*



Foto N° 8: *Diferencias de Altura entre plantines con Trichoderma harzianum y fertilización con plantines sin fertilización en presencia y ausencia de Trichoderma*

