

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE *Trichoderma harzianum*
COMO AGENTE BIOPROMOTOR Y DE BIOCONTROL
EN PLANTINES DE *Eucalyptus dunnii* Maiden.**

por

Carlos ROSSI

**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. Graciela Romero

Ing. Agr. Claudine Folch

Lic. Jorge Pereira

Fecha: -----

Autor: -----

Carlos Santiago Rossi Cabrera

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle gracias a toda mi familia, principalmente a mi madre, hermana y hermano por haberme dado fuerzas para seguir y terminar con la carrera. Este agradecimiento también quiero hacerlo extensivo a aquellos amigos que me acompañaron tanto dentro como fuera de la facultad.

En cuanto a la realización de este trabajo quiero agradecer a mi Directora de Tesis Graciela Romero por estar siempre atenta a cada paso de la investigación, al vivero La Buena Unión donde se realizó la casi totalidad del ensayo en las personas de sus administradoras Mary Carmen Rosas y Guadalupe así como a Carmen por su inestimable ayuda; al laboratorio Lage y Cía. en la persona de Claudine Folch; y a Jorge Pereira por su asistencia en uno de los temas claves de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. CONCEPTOS GENERALES.....	1
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1. <u>Objetivo general</u>	4
1.2.2. <u>Objetivos específicos</u>	4
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	6
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>EUCALYPTUS DUNNII</i>	6
2.1.1. <u>Características morfológicas</u>	6
2.1.2. <u>Origen</u>	6
2.1.3. <u>Rangos climáticos</u>	6
2.1.4. <u>Requerimientos climáticos y de suelo</u>	7
2.1.5. <u>Mejoramiento forestal</u>	8
2.1.6. <u>Características tecnológicas de la madera</u>	9
2.1.7. <u>Producción de <i>Eucalyptus dunnii</i> en el Uruguay</u>	9
2.2. CALIDAD EN PRODUCCIÓN DE PLANTINES FORESTALES	10
2.2.1. <u>Conceptos de calidad de plantín</u>	10
2.2.1.1. Parámetros morfológicos.....	12
2.2.1.2. Parámetros fisiológicos	15
2.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL PLANTÍN FORESTAL.....	17
2.3.1. <u>Requerimientos nutricionales de <i>Eucalyptus dunnii</i> en el vivero forestal</u>	17

2.3.2. <u>Interacción plantín - sustrato</u>	20
2.3.3. <u>Interacción plantín - contenedor</u>	23
2.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE <i>EUCALYPTUS</i> , PRESENTES	
EN EL VIVERO	24
2.4.1. <u>Damping-off o enfermedad de los almácigos</u>	24
2.4.2. <u>Moho gris de <i>Eucalyptus</i></u>	26
2.4.3. <u>Mancha foliar</u>	27
2.5. CONTROL BIOLÓGICO	27
2.5.1. <u><i>Trichoderma harzianum</i></u>	29
2.5.2. <u>Biocontrol de fitopatógenos y biopromoción del crecimiento vegetal</u> <u>por <i>Trichoderma harzianum</i></u>	30
2.6. BIOCONTROL POR <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	30
2.6.1. <u>Mecanismos de biocontrol</u>	31
2.6.1.1. Micoparasitismo	32
2.6.1.2. Amensalismo	32
2.6.1.3. Competencia	34
2.6.2. <u><i>Trichoderma harzianum</i> como inductor de resistencia</u>	35
2.6.2.1. Resistencia sistémica adquirida	37
2.6.2.2. Regulación hormonal en resistencia sistémica adquirida	37
2.6.3. <u>Resistencia sistémica inducida</u>	38
2.6.3.1. Mecanismos de reconocimiento y activación	40
2.6.3.2. MAP quinasas.....	43
2.6.3.3. Regulación hormonal en resistencia sistémica inducida	45
2.6.4. <u>Peroxidasas</u>	47
2.6.5. <u>Regulación de especies reactivas de oxígeno</u>	49
2.6.5.1. Peróxido de hidrógeno	50
2.6.5.2. Radical hidroxilo	51
2.6.5.3. Radical anión superóxido	51
2.6.5.4. Homeostasis redox.....	52

2.7. BIOPROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL	
POR <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	53
2.7.1. <u>Balance hormonal</u>	55
2.7.1.1. Citoquininas y el ciclo de división celular	56
2.7.1.2. Citoquininas y su relación con el genotipo.....	58
2.7.1.3. Citoquininas y regulación del crecimiento radicular.....	60
2.8. BIOFERTILIZACIÓN POR <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	61
2.9. FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO	62
DE <i>TRICHODERMA SPP.</i>	62
2.9.1. <u>Efecto nutricional</u>	62
2.9.2. <u>Efecto de la temperatura</u>	66
2.9.3. <u>Efecto del ph</u>	66
2.9.4. <u>Efecto de la humedad</u>	67
2.9.5. <u>Efecto del tipo de sustrato utilizado</u>	68
2.10. TRICHOSOIL ®	69
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	70
3.1. LUGAR, ÉPOCA Y DURACIÓN DEL ENSAYO	70
3.2. INVERNÁCULO	70
3.3. SUSTRATO	71
3.4. TRICHOSOIL®	72
3.5. BANDEJAS	72
3.6. SEMILLAS	72
3.7. SIEMBRA	72
3.8. RIEGO	73
3.9. FERTILIZACIÓN	73
3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL	74
3.11. MUESTREO	75
3.11.1. <u>En sustrato</u>	75

3.12.2. <u>En plantines</u>	75
3.12.2.1. Parámetros morfológicos	75
3.12.2.2. Parámetros fisiológicos	75
3.13. MEDIDAS REALIZADAS	75
3.13.1. <u>En sustrato</u>	75
3.13.2. <u>En plantines</u>	77
3.13.2.1. Mediciones morfológicas	77
3.13.2.2. Mediciones fisiológicas	77
3.13.2.3. Análisis de actividad peroxidasa	77
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	80
4.1. ANÁLISIS FOLIAR	80
4.1.1. <u>Nitrógeno</u>	82
4.1.2. <u>Hierro</u>	83
4.1.3. <u>Manganeso</u>	85
4.2. VARIABLE DIÁMETRO	87
4.3. VARIABLE ALTURA	89
4.4. VARIABLE PESO FRESCO DE RAÍZ	92
4.5. VARIABLE PESO SECO DE RAÍZ	93
4.6. VARIABLE PESO FRESCO DE LA PARTE AÉREA	94
4.7. VARIABLE PESO SECO DE LA PARTE AÉREA	96
4.8. NIVEL DE SUPERVIVENCIA DE PLANTINES	97
4.9. ANÁLISIS DE SUSTRATO	98
4.10. EVALUACIÓN DE ISOENZIMAS PEROXIDASAS	100
5. <u>CONCLUSIONES</u>	105
6. <u>RESUMEN</u>	106
7. <u>SUMMARY</u>	107
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	108

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Tabla correspondiente al programa de fertilización del vivero.....	73
2. Tipo de tratamientos empleados en el ensayo.....	74
3. Concentraciones foliares de macro y micronutrientes correspondientes a períodos y tratamientos diferentes	81
4. Tabla de diámetros promedio y desvío estándar según tratamiento y período.....	88
5. Tabla de alturas promedio y desvío estándar según tratamiento y período.....	91
6. Tabla de peso fresco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento	92
7. Tabla de peso seco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento.....	94
8. Tabla de peso fresco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento.....	95
9. Tabla de peso seco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento....	96
10. Tabla de supervivencia de plantines por período y tratamiento.....	97

Figura No.

1. Imagen de las instalaciones del invernáculo.	70
2. Imagen de kit de aplicación Helena, más placas de acetato.....	78
3. Imagen izq. plantín sin tratamiento; imagen der. plantín con tratamiento.....	86
4. Gráfico de diámetros promedio y desvío estándar según tratamiento y período.	89
5. Gráfico de alturas promedio y desvío estándar según tratamiento y período.	90
6. Gráfico de peso fresco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento	93
7. Gráfico de peso seco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento.....	94
8. Gráfico de peso fresco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento	95

9.	Gráfico de peso seco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento	96
10.	Placa de agarosa donde se visualizan las bandas de migración por tratamiento, indicadas por los números 1 y 2.	101
11.	Imagen de la placa anterior pero con ajustes cromáticos donde se visualiza la mayor migración de la banda 2 hacia el polo negativo	101

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTOS GENERALES

El sector forestal en el Uruguay tuvo una fuerte expansión a partir de la década de 1970 impulsado por políticas forestales nacionales. A través de la aplicación de leyes y más específicamente decretos, programas, estrategias e instrumentos de políticas de fomento se empieza a ampliar la base forestal del país.

El área total de plantaciones forestales bajo proyecto en el período 1975-2008 con plan de manejo es de 812.164 hectáreas. La superficie que corresponde al género *Eucaliptus* es de 569.367 hectáreas, de la misma en particular el 45% corresponde a *E. globulus*, el 34% pertenece a *E. grandis*, y una fracción menor del 7% a *E. dunnii* que afecta a 39.907 hectáreas (URUGUAY. MGAP. DGF, 2008).

Si bien esta última especie no ha sido muy considerada como recurso forestal, ha tenido un importante ascenso en hectáreas plantadas a partir del 2005 en los departamentos de Paysandú, Río Negro y Durazno debido principalmente a mejores comportamientos sanitarios.

Actualmente hay en el país una política forestal de estado bien definida y estructurada a través de la legislación vigente (Polla, s.f.), que permite un proceso de desarrollo creciente del sector. Uno de los lineamientos principales de esta política es lograr un desarrollo sostenible a lo largo de toda la cadena forestal.

Para lograr este objetivo y situándonos en la línea ambiental de dicho tipo de desarrollo, se deberán incrementar las acciones referentes a la protección forestal en el manejo de organismos fitopatógenos tanto en plantación como en viveros forestales.

Cabe destacar entonces, que en los últimos años los destinos principales de los fondos asignados a la investigación forestal estuvieron dirigidos hacia estos temas.

En este contexto uno de los puntos salientes en el desarrollo forestal que tiene el país e importante también en la mencionada cadena forestal es la innovación tecnológica actual de los viveros forestales, los cuales, en el transcurso de estos últimos años han incorporado tecnologías apropiadas para acrecentar los estándares de producción y de calidad.

Estas innovaciones se originan a partir de la creciente demanda y exigencia de la industria del sector, enmarcada en el concepto sustentable, por la producción de plantines dentro de los parámetros de calidad, uniformidad y sanidad requeridos.

Hay que tener en cuenta que el factor más importante en el éxito de un vivero forestal es asegurar estos parámetros, debido a que una calidad deficiente de los plantines en la etapa de vivero influye directamente en la calidad de la plantación en el momento de la cosecha final.

Continuando el lineamiento de este trabajo, hay que resaltar los esfuerzos que algunos viveros forestales realizan para estructurar tecnología apta para optimizar estos parámetros de producción, reduciendo a su vez, el impacto ambiental al restringir el uso de agroquímicos mediante la introducción de microorganismos como controladores biológicos de organismos fitopatógenos y/o biofertilizantes.

En el plan de un manejo integrado de plagas, que tiene como objetivo un tratamiento fitosanitario integral, una de las herramientas tecnológicas innovadoras es el control biológico que por medio del uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, reducen o eliminan sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano y Galindo, s.f.).

La combinación entonces de agentes de biocontrol, con niveles reducidos de fungicida, promueven un grado de supresión de la enfermedad similares a los obtenidos en tratamientos con uso total de fungicidas (Monte, citado por Benítez et al., 2004).

Es en este marco entonces que se encuadra la utilización del género *Trichoderma* spp., especialmente *Trichoderma harzianum* en viveros forestales, como uno de los microorganismos más usados como agente de control biológico, antagonista por diversos mecanismos de un amplio espectro de hongos fitopatógenos.

Este organismo es utilizado además como biopromotor del crecimiento vegetal; e inductor de resistencia a enfermedades, características ampliamente comprobadas en numerosas investigaciones.

Estudios anteriores realizados en viveros forestales, ya abordaron temas concernientes a la calidad en la producción de plantines forestales en cuanto a la caracterización, definición y posible normativa de parámetros de calidad de los mismos, así como la afectación de dichos parámetros por la asociación con diversos organismos biológicos, sobre diferentes especies arbóreas.

Por consiguiente en este trabajo, además de estos tópicos, se determinará el potencial y la eficacia de *Trichoderma harzianum* inoculado en sustrato, asociado a plantines de *Eucaliptus dunnii* (una especie poco trabajada en el país), para promover la calidad de los mismos según los parámetros de calidad caracterizados en viveros.

La influencia en el vegetal de la acción biocontroladora de fitopatógenos y biopromotora del crecimiento del agente biológico en cuestión, serán evaluadas a través de parámetros morfológicos y fisiológicos.

Un estudio interesante que se incluirá en esta investigación y que raramente es utilizado como parámetro de calidad sanitaria del plantín, debido a su alto costo

operacional, es la evaluación de metabolitos inducidos (actividad peroxidasa) en el vegetal. Este producto metabólico es generado en el huésped por el agente de biocontrol.

Debido a que es conocida la acción de esta enzima en mecanismos antipatógenos, esta evaluación nos brindará no solo una medida más eficaz en cuanto a capacidad de resistencia a enfermedades por parte de la planta que otras apreciaciones, sino también la capacidad de *T. harzianum* como inductor de resistencia.

Se determinará además la capacidad en la colonización y supervivencia de *Trichoderma harzianum* en el sustrato utilizado por la empresa viverista, en el ciclo de producción de plantines de *E. dunnii*.

El ensayo se llevó a cabo en el vivero forestal “La Buena Unión” perteneciente a la empresa Terrasys, ubicado en Ruta No. 5 km. 456; departamento de Rivera, Uruguay.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

El objetivo de este ensayo es evaluar el efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* como agente biopromotor y de biocontrol en plantines de *Eucalyptus dunnii* en vivero.

1.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar y cuantificar a través de parámetros morfológicos y físicos si *Trichoderma harzianum* en sustrato promueve el crecimiento de plantines de *Eucalyptus dunnii*.

- Evaluar a través del estudio isoenzimático de peroxidasas si *Trichoderma harzianum* induce resistencia a enfermedades actuando a nivel endógeno en el vegetal.
- Evaluar y cuantificar la supervivencia y colonización de *Trichoderma harzianum* en sustrato durante el período de crecimiento y desarrollo de plantines de *Eucalyptus dunnii* en vivero.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Eucalyptus dunnii*

2.1.1. Características morfológicas

Es un árbol de fuste recto que alcanza los 35 metros promedio de altura; de follaje denso y péndulo, con presencia de hojas opuestas (4-10 x 3-7cm.) cuando juveniles; y alternas, pecioladas y lanceoladas (10-20 x 2-4cm.) en la etapa adulta. Corteza persistente y escamosa en la base del tronco, de color castaño grisácea; y caduca en largas fajas grisáceas en el resto del mismo. Presenta flores en inflorescencias simples, axilares y frutos hemisféricos con fuertes valvas exsertas; floreciendo a fines primavera y verano (Brussa, 1994).

2.1.2. Origen

En origen la especie tiene una distribución restringida en la región central-este de Australia, en zonas continentales principalmente, entre el noreste de Nueva Gales del Sur y sureste de Queensland. Se distribuye en dos poblaciones disjuntas separadas aproximadamente 140 km. La población del sur se localiza entre Coffs Harbour (Grafton) y Nuevas Gales del Sur; y la población restante se ubica a lo largo de la frontera entre Nuevas Gales del Sur y Queensland (Lee et al., 2006).

2.1.3. Rangos climáticos

En su ambiente natural, *E. dunnii* se encuentra en zonas con un rango de 350 a 750 metros sobre el nivel del mar, en fondos de valles y laderas bajas; de clima templado, con un promedio de temperaturas máximas de 27-30°C y mínimas de 0 a 3°C, con hasta 60 heladas por año. El clima en origen es húmedo, con precipitaciones

relativamente altas concentradas en el verano del orden de 1.000 a 1.750 mm anuales, aproximadamente el 20% de esta precipitación anual cae dentro de los cuatro meses más secos. (Lee et al., Boland et al., citados por Brussa, 1994).

2.1.4. Requerimientos climáticos y de suelo

Los rendimientos de las plantaciones esta relacionada a las características climáticas y nutricionales, entre otras variables, de la región donde se quiera cultivar una determinada especie forestal. Esto nos permite definir regiones potencialmente aptas para las especies a insertar considerando las condiciones de suelo y clima del origen geográfico de la especie en cuestión.

Las necesidades climáticas de *E. dunnii* son similares a las de *E. grandis*, siendo apto para regiones con un índice pluviométrico de más de 950 mm anuales sin déficit hídrico o con un déficit muy bajo. Tiene la ventaja sobre esta especie de ser menos sensible a las bajas temperaturas y heladas, por lo tanto puede resultar un buen sustituto de *E. grandis* en regiones donde se producen temperaturas mínimas de -7 °C. (CIEF, 1985). Haciendo referencia a trabajos de investigación sudafricanos se sugiere un rango óptimo de temperatura media anual de 15.5-18.5°C para la producción de *E. dunnii* (Lee et al., 2006).

Si bien una región puede ser considerada apta climáticamente para una especie, pueden encontrarse áreas dentro de la misma con condiciones de suelo marginales que tornan inadecuada su utilización. Los suelos en el área de distribución natural de *E. dunnii* tienden a ser profundos, de alta fertilidad, buena capacidad de retención de agua y buena aireación (Lee et al., Kelly, citados por Brussa, 1994). Datos de investigaciones sudafricanas indican que la especie no debe plantarse en suelos con mal drenaje; y en Brasil el rendimiento de esta especie se vio disminuido en suelos pobres en relación con *E. grandis* (Lee et al., 2006).

2.1.5. Mejoramiento forestal

Otra variable importante a tener en cuenta, ligada a los conceptos mencionados en la primera parte, es la pureza genética del material con el que se trabaja y el conocimiento de su procedencia para lograr buenos rendimientos. Si la especie, con respecto a su origen, no está bien representado ecológicamente o tienen un índice de hibridación acentuado, o una excesiva heterogeneidad, los resultados productivos serán negativos (CIEF, 1985).

Si este es el caso, en plantación se visualizarán variabilidad de comportamientos con diferentes índices de crecimiento, formas del fuste diferentes, distintos grados de sensibilidad a las bajas temperaturas, así como también diferentes grados de resistencia a los ataques de enfermedades (CIEF, 1985). Y finalmente el crecimiento puede ser tan reducido que afecte la producción total a la edad de rotación.

En relación a estos puntos, la desventaja de *E. dunnii* es que tiene problemas en cuanto a la pureza de la semilla obtenida ya que tiene facilidad para hibridarse con otras especies como *E. grandis* y *E. viminalis*. Otra desventaja a mencionar es la pobre producción de semilla en cantidades compatibles con las demandas comerciales, debido a problemas en la floración y a que ésta recién se produce a edades superiores a los 10 años, más tardíamente que otras especies de Eucaliptus (EMBRAPA, citado por Marco et al., 1991).

Los orígenes y/o procedencias destacadas para *E. dunnii* son las siguientes: Urbenville, NSW, Australia; Coffs Harbour, NSW, Australia; Moleton, NSW, Australia.

2.1.6. Características tecnológicas de la madera

Hay pocas investigaciones de esta especie como fin maderero, aunque se reconoce como un producto de calidad media, utilizándose en carpintería generalmente en construcciones livianas. Sin embargo estudios realizados en Sudáfrica demuestran que ciertos orígenes y variedades de *E. dunnii* permiten alcanzar buenos parámetros madereros en cuanto a la calidad de sus componentes (Lee et al., 2006).

En cuanto a la producción de papel, dicha especie se esta convirtiendo cada vez más en la elegida para la producción de pasta ya que tiene propiedades similares a la de *E. grandis* (Swain y Gardner, citados por Smith y Henson, 2004), pero un mayor rendimiento de pulpa y propiedades superiores en el papel producido (Backman y De León, citados por Smith y Henson, 2004). Por consiguiente, amplias zonas están siendo sembradas en China, América Central, América del Sur, Sudáfrica y la costa oriental de Australia (Smith y Henson, 2004).

2.1.7. Producción de *Eucalyptus dunnii* en el Uruguay

El área total de plantaciones forestales correspondientes al género *Eucalyptus* bajo proyecto en el período 1975-2008 con plan de manejo es de 569.367 hectáreas. De esta superficie una fracción menor del 7% corresponde a *E. dunnii* que afecta a 39.907 hectáreas (URUGUAY. MGAP. DGF, 2008).

Si bien esta última especie no ha sido muy considerada como recurso forestal en el país, ha tenido un importante ascenso en hectáreas plantadas a partir del 2004 en los departamentos de Paysandú y Río Negro, y a partir del 2007 en el departamento de Durazno.

Una de las posibles explicaciones de este ascenso es el mejor comportamiento sanitario de *E. dunnii* frente a nuevas enfermedades emergentes en relación a otras especies forestales. La mancha foliar causada por agentes fúngicos, pertenecientes al género *Mycosphaerella* spp., es la principal enfermedad que está afectando a plantaciones especialmente de *Eucalyptus globulus* en el Uruguay, provocando reducciones importantes en volumen, además de un descenso en el porcentaje de supervivencia de los individuos.

Resultados obtenidos por el Programa Forestal del INIA a cargo de Rachid (2006), demostraron que *E. dunnii* presenta mayor resistencia que *E. globulus* a esta enfermedad. Con respecto a su comportamiento forestal esta especie ha demostrado muy buena productividad y potencial para la producción de celulosa. Además, tiene una gran capacidad de adaptación a diversos ambientes, ya que tiene una alta tolerancia a heladas. Por lo tanto *E. dunnii* es una buena opción para sustituir *E. globulus* en zonas en que esta especie no tiene buenos resultados productivos en zonas atacadas por *Mycosphaerella* spp.

2.2. CALIDAD EN PRODUCCIÓN DE PLANTINES FORESTALES

2.2.1. Conceptos de calidad de plantín

La calidad y el potencial de la plantación en el momento de cosecha final está relacionada directamente con la calidad del plantín en la etapa de vivero. Esta calidad está determinada por el material genético de la semilla usada y por las técnicas de producción. Por lo tanto es significativo controlar y normatizar parámetros de calidad basados en criterios cuantitativos y cualitativos para definir una planta de buena calidad en cada etapa del proceso productivo del vivero forestal.

El estudio de las correlaciones entre estos parámetros asociados a calidad del plantín en la etapa de vivero y el comportamiento final de éste en plantación, permitiría concentrarse en aquellos factores externos e internos de la planta que influyan en lograr que el plantín, a través del manejo de determinadas variables, tenga la capacidad para sobrevivir al stress ambiental en el campo y producir un crecimiento vigoroso tras su trasplante (Ortega et al., 2006).

Por lo tanto, la selección de un plantín de calidad debe estar siempre en función de minimizar los efectos que, en el establecimiento y crecimiento inicial de las plantas, tienen los factores limitantes del lugar de plantación (Ortega et al., 2006). O sea, serían las características edafoclimáticas (riesgo de heladas, sequía, etc.) del sitio, las que definirían los conceptos de calidad hacia atrás en la etapa de vivero.

Esto permitiría identificar parámetros morfológicos y fisiológicos de importancia en el vivero, para cada sitio forestal a repoblar. Por tanto no habría en sí conceptos absolutos de calidad, sino indicadores de calidad de plantín para cada sitio y especie (Ortega et al., 2006).

El manejo de estas variables condicionan los indicadores morfológicos, fisiológicos y sanitarios del plantín; influenciados a su vez por el material genético utilizado y procedencia de las semillas, el manejo del agua, el manejo adecuado de la fertilización, las características físicas del sustrato, y la selección del contenedor adecuado, entre otros.

Estas variables o factores que influyen en la calidad del plantín a producir, se analizarán en capítulos posteriores, en los cuales se profundizará además, teniendo en cuenta un factor importante como es la sanidad en este concepto de calidad vegetal, el estudio y descripción del uso del control biológico de fitopatógenos por organismos

fúngicos, así como la capacidad de éstos en la biopromoción del crecimiento y desarrollo de los plantines.

A continuación se analizarán aquellos parámetros y criterios morfológicos y fisiológicos utilizados para la evaluación de calidad del plantín, en función siempre de la mejora en crecimiento y desarrollo final en plantación.

2.2.1.1. Parámetros morfológicos

Los parámetros más utilizados para determinar la calidad de los plantines son los parámetros morfológicos. Aunque algunos trabajos indican que son pobres indicadores del desempeño posterior del plantín a campo (Wakeley, citado por Lavender, s.f.), la mayoría de los viveristas concuerdan en que los parámetros morfológicos pueden ser utilizados como un factor de predicción cualitativa del futuro comportamiento de la planta en el campo (Cóppola et al., 2000).

De todas maneras según Gomes, citado por García (2007), la aplicación de este tipo de indicadores no permite responder eficazmente a las exigencias en cuanto a supervivencia y crecimiento, determinado por las adversidades encontradas en el campo después de la plantación.

Por tanto y en atención a esta limitación, Grossnickle, citado por Ortega et al. (1991), propone utilizar índices más útiles a los objetivos buscados, esto es, indicadores que expresen el comportamiento potencial intrínseco del plantín pero inmediatamente después de su transplante, con el fin de caracterizar la calidad de las plantas hacia atrás en el vivero y poder de esta manera predecir su comportamiento posterior a campo.

La altura del plantín es el criterio más utilizado de todos los parámetros, según encuestas realizadas en viveros forestales. Sin embargo su confiabilidad es cuestionada,

ya que según los numerosos muestreos realizados, fue el parámetro que más variabilidad presentó (García, 2007). Ahora bien, si se correlaciona este dato con la medida del diámetro del tallo su eficacia como indicador de calidad mejora (INIFAP, citado por Cópola et al., 2000).

Sin embargo, ensayos a campo realizados por Thompson, citado por García (2007), donde se evaluó la correlación entre parámetros y comportamiento a campo de plantines, han demostrado que el diámetro de cuello es el mejor predictor individual del crecimiento y supervivencia en plantación. Esta afirmación también es compartida por Schmidt, citado por Cópola et al. (2000) que comprobó una alta correlación entre este parámetro y la supervivencia y productividad a campo del plantín.

Esto es así porque este parámetro puede reflejar el tamaño del sistema radicular y por tanto ser determinante con valores altos, en la resistencia al doblamiento, tolerancia al daño causado por insectos y animales (INIFAP, citado por Cópola et al., 2000).

A este parámetro además se le pueden asociar apreciaciones visuales y táctiles del estado del cuello del plantín, que si bien son subjetivas, son útiles para un viverista experimentado. Por ejemplo, coloraciones oscuras del tallo están relacionadas a mayores niveles de lignificación y mayor dificultad por tanto al arqueamiento del mismo (Cópola et al., 2000).

La morfología y desarrollo de la raíz también son características significativas que se deben tener en cuenta a la hora de caracterizar un plantín de calidad, ya que anomalías en este órgano afectarán el desarrollo posterior de la planta en el campo.

El daño radicular es causa de enfermedades en la planta porque impide la normal absorción de agua y nutrientes, provocando un desequilibrio raíz/parte aérea.

Esto vuelve a las plantas más vulnerables a los efectos de la competencia, los cambios de temperatura y disponibilidad de agua, presentando por lo tanto un menor crecimiento e incluso muerte por estrangulamiento de las raíces o volteo por acción del viento (Alfenas et al., citados por García, 2007).

Para la producción de un sistema radical funcional con una buena capacidad de captación de nutrientes y almacenamiento de reservas, se debe tener muy en cuenta el manejo de las condiciones físico-químicas del sustrato y una buena elección del contenedor (Ortega et al., 2006).

Otro parámetro que se tiene en cuenta es el peso seco de la planta, ya que es un índice útil de desarrollo de la misma, y es necesario además para el cálculo de la relación tallo/raíz, un parámetro más usado por viveristas que el criterio de peso seco. Ya que éste último requería más mano de obra y conocimientos para interpretar los resultados (Cóppola et al., 2000).

En cuanto al peso de la parte aérea, un mayor valor de este parámetro en relación al peso radicular puede significar un mayor desarrollo del plantín en la etapa de plantación (Simposio de Viscosa, citado por Cóppola et al., 2000). Sin embargo para que esto se cumpla el peso aéreo no debería llegar a doblar el peso de la raíz (Montoya, citado por Cóppola et al., 2000).

El estado nutricional es un parámetro muy significativo a tener en cuenta, generalmente la apreciación del nivel nutricional de los plantines es visual. A través de la observación de diferentes coloraciones en el vegetal se infieren las deficiencias en macro y/o micronutrientes. Sin perjuicio de esto los análisis foliares son cada vez más demandados para determinar con más precisión los niveles nutricionales de las plantas.

Finalmente el estado sanitario de los plantines llevados a plantación es muy importante. Habitualmente no se hacen aplicaciones rutinarias en este sentido, sino que las mismas se basan en criterios de apreciación de condiciones ambientales que favorezcan las condiciones de ataque por fitopatógenos.

Para un raconto en cuanto a los parámetros morfológicos en plantines que más se correlacionan positivamente con supervivencia, crecimiento y desarrollo de los mismos en plantación, se manejarán los siguientes datos. Un plantín de buena calidad debe tener un diámetro grande relativo de cuello; una baja relación altura/diámetro de cuello; un sistema radicular fibroso y equilibrado en su forma; una buena arquitectura de la parte aérea, una alta relación biomasa de raíz/biomasa aérea, y finalmente un buen estado sanitario (Guifan, citado por García, 2007).

2.2.1.2. Parámetros fisiológicos

Según Cóppola et al. (2000), en la apreciación de la calidad del plantín, se utiliza como criterio tanto la altura como el diámetro de cuello a alcanzar, a la hora de seleccionar plantas listas para plantación. Pero en este proceso de selección de plantines aptos para transplantar no se utilizan otras características morfológicas ni atributos fisiológicos que pueden llegar a ser útiles para determinar la supervivencia del material en la etapa de plantación

Por lo tanto, para determinar diferencias en el estado de una planta es importante la medición de estos atributos, aunque se debe tener en cuenta que esta valoración se refiere a un momento determinado de la planta. Las variables a analizar son, nivel de nutrientes, carbohidratos de reserva y estado hídrico, entre otros.

La utilización del análisis foliar es una de las técnicas cada vez más empleada para conocer el estado nutritivo de las plantaciones de *Eucaliptus* y asesorar las

fertilizaciones mas adecuadas, ya que los factores fisiológicos como resistencia a heladas, capacidad de crecimiento radicular y resistencia a sequía, importantes en la etapa de plantación, están afectados por el nivel nutricional de la planta (García, 2007). Este análisis en definitiva ayuda al viverista a identificar y corregir problemas nutricionales, y además es útil para probar nuevos regímenes de fertilización.

Se ha comprobado mediante ensayos, que los parámetros fisiológicos de plantines con niveles óptimos de nutrientes se adaptan mejor al stress de plantación. Por ejemplo, el contenido de nitrógeno foliar se correlaciona positivamente con el tamaño de la planta, aunque niveles altos de fertilización generan plantas desbalanceadas en la relación volumen aéreo-volumen raíz (Etter, citado por García, 2007).

La evaluación de niveles de carbohidratos como sacarosa y almidón en planta cuando se acerca el transplante son útiles para evaluar la calidad de la planta. Ya que éstas al ser llevadas a campo no pueden continuar inmediatamente los procesos fotosintéticos debido al estrés de plantación (Cóppola et al., 2000), dependiendo entonces de las reservas de carbohidratos en la etapa de vivero.

En cuanto a la valoración de la rusticidad hay estudios que analizan el contenido de antocianinas en tallo, ya que estos pigmentos están relacionados a mecanismos fotoprotectores que aumentan la tolerancia a descensos en la fotosíntesis que se dan inmediatamente en la etapa de plantación. Además contribuyen en la regulación osmótica en condiciones de estrés hídrico (Hoch et al., citados por García, 2007).

Un parámetro fisiológico poco utilizado relacionado con la sanidad en plantines, es la medición de la actividad enzimática específica peroxidasa, relacionada a mecanismos de resistencia sistémica en el vegetal, inducidos por agentes biocontroladores como *T. harzianum*. Este parámetro indica una mayor capacidad de

resistencia a posibles infecciones por patógenos, siendo por lo tanto importante como característica fisiológica de calidad del plantín. Más adelante se tratará sobre la inducción de actividad de esta enzima y su importancia a nivel fisiológico en la planta.

2.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL PLANTÍN FORESTAL

2.3.1. Requerimientos nutricionales de *Eucalyptus dunnii* en el vivero forestal

La adecuación y ajuste de los requerimientos nutricionales es decisivo para el desarrollo de los plantines y para la obtención de los mismos dentro de los parámetros de calidad exigidos, ya que las deficiencias tanto de macro como de microutrientes en *Eucalyptus* son comunes en viveros forestales (Romero y Marius, 2002).

Por consiguiente el manejo correcto de la fertilización es una tecnología que facilita la obtención de plantines forestales de óptima calidad, con alto potencial de crecimiento, y por otra parte acorta la estadía de los mismos en el vivero mejorando el resultado económico (von Wernich et al., s.f.).

Citando una característica que es crítica para el manejo silvicultural en el Uruguay, como es la ocurrencia de heladas, hay estudios que demuestran la influencia del nivel nutritivo en la sensibilidad al frío en especies forestales. Aquellas plantas fertilizadas con mayores concentraciones foliares en N, P y K, demuestran más resistencia al frío que aquellas no fertilizadas o con concentraciones foliares críticas (Rikala y Repo, citados por Español et al., 2000).

Sin embargo, estudios de fertilización realizados en plantines forestales, concluyeron que era más importante el balance que la cantidad en el nivel de nutrientes a la hora de definir la capacidad de los plantines de superar con éxito la etapa de transplante y primeras etapas de plantación (von Wernich et al., s.f.).

Otras enfermedades pueden ser controladas con la aplicación de hierro en el medio, y la resistencia a heladas en plantación mejora con el agregado de micronutrientes como el boro. Por consiguiente es determinante un buen desarrollo, forma y vigor del plantín debido a un logrado equilibrio de nutrientes, ya que estas características están relacionadas con la posterior calidad de la plantación.

Se debe tener en cuenta que las plantas al ser transplantadas y llevadas al sitio de plantación no pueden realizar la fotosíntesis por un determinado tiempo, por tanto en este período dependen de que sus reservas de carbohidratos hayan sido adecuadas en la etapa de vivero (Cóppola et al., 2000).

En cuanto a los requerimientos nutricionales de *E. dunnii* en particular, en la etapa de vivero, este trabajo se referirá al plan y programa de manejo de fertilización otorgado por la empresa. Los nutrientes usados por la misma son; nitrógeno, fósforo, potasio y micronutrientes. Dicho plan se divide en tres fases:

La fase 1 inicia a los 15 días de la siembra, haciendo énfasis en el agregado de fósforo en las formulaciones, con una proporción 2 a 1 en relación al nitrógeno. El agregado de micronutrientes se contempla para las tres fases del programa, ya que se considera indispensable para el desarrollo y calidad del plantín. En esta etapa lo que se intenta es potenciar un buen desarrollo radicular.

El fósforo es requerido para almacenar y transformar energía (ATP) y para el transporte de carbohidratos entre otras funciones. Deficiencias de este elemento se visualiza en el plantín por el color púrpura-rojizo de sus hojas. Por otra parte la incorporación de micronutrientes, especialmente el boro, es necesario para las células vegetales en la división celular; crecimiento de las mismas y funciones de la membranas en ápices. Su deficiencia causa muerte progresiva de las yemas terminales (Romero y Marius, 2002).

La fase 2 prioriza el incremento de nitrógeno en las formulaciones, con una proporción a la inversa en esta etapa de 2 a 1 en relación al fósforo, para favorecer el desarrollo foliar y fortalecer la parte aérea del plantín logrando una buena arquitectura general del plantín, que son los objetivos buscados en esta etapa.

El nitrógeno es elemental para la constitución de proteínas, clorofilas, enzimas y ATP entre otros componentes, por lo tanto las plantas deficientes en este nutriente aparecen cloróticas. Sin embargo se debe señalar que niveles elevados de fertilización con este nutriente generan plantines desbalanceados, con un aumento de su parte aérea en relación a las raíces, lo que puede ocasionar problemas en plantaciones en suelos con deficiencia de agua (García, 2007).

La fase 3 hace énfasis en la incorporación de potasio además de fósforo, reduciendo por otro lado las cantidades de nitrógeno agregadas. El potasio es importante en la función de estabilización del pH, turgencia y osmorregulación. En esta fase de terminación de los plantines, el objetivo al agregar mayores dosis de potasio, es frenar el desarrollo de la parte aérea y favorecer la lignificación del tallo. Esto fomenta la rustificación del plantín y acorta este período, disminuyendo su susceptibilidad al estrés ocasionado por el trasplante, preparándolo entonces para su etapa en plantación.

Las plantas fertilizadas con un adecuado programa de fertilización según los fines de producción forestales, tienen una mayor capacidad de resistencia en plantación. Al respecto, ensayos de fertilización realizados por von Wernich (s.f.) indican que la combinación adecuada de nutrientes en la etapa de terminación, con descensos en las cantidades de nitrógeno y ascensos en potasio, mejora sustancialmente la resistencia a heladas al momento de trasplante a campo.

Continuando esta misma línea, otros trabajos afirman que el agregado de magnesio junto al potasio en esta etapa aumenta la capacidad de resistencia a la sequía en los plantines transplantados (Lavender, s.f.).

2.3.2. Interacción plantín - sustrato

La calidad de los plantines depende, entre otras variables, de la adecuada selección de sustratos para la preparación de medios de crecimiento (Sánchez et al., 2008). A su vez Burés, citado por Sánchez et al. (2008), indica que una mezcla adecuada debe tener propiedades físicas y químicas que permitan la disponibilidad oportuna de los nutrientes y el agua.

Cada mezcla, con sus características de densidad, porosidad, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico y pH, le proporcionarán características diferentes de desarrollo y crecimiento a la planta (Sánchez et al., 2008).

Landis, citado por Sánchez et al. (2008), afirma que en el caso de utilizar sustratos de corteza compostada, ésta posee mayor capacidad de intercambio catiónico (CIC) que otros materiales a base de corteza sin compostar, por lo tanto cuanto mayor sea la CIC mejor es el material en cuanto a la acumulación de cationes disponibles.

Sin este proceso de compostaje los residuos de origen orgánico tienen altas relaciones C/N. Estas relaciones limitan la disponibilidad de nitrógeno al ser utilizado éste por los microorganismos, reduciendo entonces la CIC del material, y presentándose por tanto deficiencias de este nutriente. Es por este motivo que el sustrato a base de corteza adecuadamente compostada, favorece la disponibilidad de cationes para las plantas (Sánchez et al., 2008).

Sin embargo cabe aclarar que el uso de material orgánico compostado, independientemente de su porcentaje en la mezcla de sustrato, aporta un bajo nivel relativo de nutrientes para la planta y aún más para los requerimientos del sistema microorganismo-vegetal. En el marco de este trabajo este concepto es importante a la hora de incluir agentes biológicos en la rizósfera.

Se sabe que *Trichoderma* compite por los nutrientes con la planta, por lo tanto se puede inferir que ya desde el inicio del ciclo del plantín, es determinante para promover el desarrollo de *Trichoderma* y bajar los niveles de competencia en el sistema mencionado, elevar el nivel de nutrientes en el sustrato. De esta manera se optimiza la disponibilidad de nutrientes en el sistema microorganismo-vegetal, y se aprovecha ya en etapas iniciales, todo el potencial del agente como biocontrolador y promotor del crecimiento.

Sin perjuicio de lo anterior la ventaja de usar materiales orgánicos compostados en mezclas de sustratos estriba en que mejora las características físicas y químicas del medio. Por ejemplo, en cuanto a su capacidad de intercambio catiónico, estos materiales orgánicos son eficaces en la retención de los nutrientes aplicados y posteriormente utilizables por la planta, en comparación con materiales de origen inorgánico, como la vermiculita, arena, perlita, etc.

En atención al concepto anterior, este tipo de materiales compostados también son eficientes si tienen una CIC alta, estabilizando el pH del medio al aumentar la capacidad de retención de cationes. Por consiguiente, se debe tener especial atención en los procesos de compostaje para obtener del material estas características tan útiles. Ya que procesos de compostaje de corteza no adecuados son la causa de producción de sustancias fitotóxicas, originarias del propio material o por el compostaje en sí, como terpenos, compuestos fenólicos y resinas, que afectan el desarrollo y supervivencia de microorganismos rizosféricos (Cárdenas, 2003).

Un aspecto a tener en cuenta es el efecto de las propiedades físicas del sustrato sobre la raíz. En estudios realizados por Wrigth, citado por García (2007) en viveros forestales, un alto porcentaje de plantines presentaron defectos en la forma de la raíz por resistencia mecánica a consecuencia de que el sustrato utilizado era de granulometría gruesa.

En cambio, en sustratos de granulometría fina, las raíces obtienen un mejor desarrollo y forma como demostró (García et al., citados por García, 2007). Sin embargo Sánchez et al. (2008) indica que estas granulometrías finas pueden traer problemas de aireación en las raíces por haber menos macroporos, y por otro lado con más microporos la retención de humedad es más alta. Sustratos saturados de humedad originan ambientes anaeróbicos que pueden afectar la capacidad fotosintética de la planta, causar pudrición de raíces y favorecer además el crecimiento de patógenos.

Como se mencionó antes, es importante ajustar los porcentajes de los materiales usados en mezclas de sustrato, para lograr una buena interrelación entre las variables físicas y químicas a favor del desarrollo del plantín. Esto lo ilustra Sánchez et al. (2008) mediante diferentes ensayos en donde se comprobó que a medida que los porcentajes de corteza aumentan en una determinada mezcla disminuye el valor de disponibilidad de agua para la planta, perjudicando entonces el desarrollo vegetal.

Por otra parte hay que tener en cuenta que la capacidad de intercambio catiónico del sustrato o combinaciones de sustratos que se manejen, es una variable significativa en cuanto a los niveles de fertilización a ajustar. Por ejemplo los sustratos a base de turba rubia, muy utilizados en viveros, tienen baja CIC por lo que se deben hacer constantes aplicaciones de fertilizantes en este tipo de materiales.

Además al ser la densidad de los mismos generalmente baja, el contenido de nutrientes para las plantas podría disminuir rápidamente con los frecuentes riegos que se

aplican en viveros (Irisity, citado por Añón et al., 2004). De todas maneras el uso de estos tipos de sustratos inorgánicos mejoran mucho las propiedades físicas de la mezcla final.

2.3.3. Interacción plantín - contenedor

El uso de contenedores o envases para producir plantas tiene la ventaja principal, entre otras, de permitir modular el desarrollo de las plantas y por tanto ajustar sus requerimientos a la demanda según las condiciones del sitio a repoblar.

De acuerdo con Marcelli, citado por Ortega et al. (2006) el contenedor deberá tener un volumen mínimo que permita conseguir un desarrollo equilibrado de la planta, y al mismo tiempo presentar una densidad de cultivo adecuada para limitar la competencia y favorecer tanto el crecimiento en diámetro del tallo como su lignificación, además de garantizar un adecuado grado de humedad a la vez que una buena aireación del sustrato, e impedir o reducir las deformaciones de las raíces.

Principalmente el contenedor debe mantener la humedad y aireación del sustrato, así como impedir las deformaciones radiculares. Si la raíz sufre daños en fases tempranas de su desarrollo debido al confinamiento en un contenedor, esto causará anomalías con efectos negativos sobre el crecimiento.

Estas anomalías pueden hacerse patentes al año de plantación, o bien durante los primeros años post trasplante, ocasionando inclinación excesiva e incluso caída de árboles (Ortega et al., 2006). Además según Rune, citado por García (2007), al afectar el sostén de la planta puede llevar más adelante a la formación de madera de compresión.

El espaciamiento de los contenedores en la bandeja compone la densidad de los plantines y esta afecta en forma determinante al crecimiento. Como en general la calidad

de la planta se incrementa con un descenso en la densidad, plantines producidos en bandejas con celdas muy juntas, tienen valores altos en altura pero menores diámetros de cuello y menor biomasa producida lo que compromete su desarrollo posterior.

Se debe tener en cuenta que la utilización de contenedores implica el crecimiento confinado de la planta, por lo tanto es preciso ajustar la nutrición y adecuar las propiedades físico-químicas del sustrato en estos envases.

2.4. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE *Eucalyptus*, PRESENTES

EN EL VIVERO

Debido a las condiciones de alta temperatura y humedad presentes en el vivero forestal, las plantas que se producen están expuestas a problemas sanitarios. Entre los agentes patógenos responsables de enfermedades forestales, los hongos son considerados los más relevantes en la fase de vivero.

2.4.1. Damping-off o enfermedad de los almácigos

En cuanto a hongos que sobreviven en el suelo, los que forman el complejo damping-off son muy importantes. Esta enfermedad causa altos niveles de daño de manera rápida, lo que provoca gastos por la reposición de plantines y retardando la planificación establecida (Romero, 2004).

Básicamente el daño que produce esta enfermedad y que puede observarse fácilmente es la podredumbre de los tejidos a nivel del cuello del plantín. Posteriormente éste se vuelca y cae, observándose al principio que la planta mantiene todavía sus hojas frescas.

Esta enfermedad ocurre rápidamente después de la germinación y su incidencia es mucho menor una vez que se ha endurecido el tallo de la planta. Por lo tanto es importante ajustar los niveles de nitrógeno en la primera etapa de producción para no generar estructuras muy tiernas, ya que esto aumenta la susceptibilidad a esta enfermedad.

Los daños que se pueden enumerar causados a la planta son los siguientes:

- fallas de germinación
- ataque de pre-emergencia
- ataque de post-emergencia
- ataque de copas “top-killing”
- podredumbre de raíz “root-rot”

Los agentes predominantes del complejo damping-off en nuestro país son *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotium* spp., *Phytophthora* spp etc. Las diferentes exigencias en cuanto a humedad atmosférica y temperatura favorecen el desarrollo de algunos de estos agentes en detrimento de otros, de todas maneras las altas temperatura presentes en el vivero favorece en todos los casos el proceso de infección (Romero, 2004).

Numerosos estudios demuestran el manejo de este complejo por el uso de control biológico. Herrera (2005) demostró el antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. en tomate cultivados bajo invernaderos. Por su parte Ezziyyani et al. (2004) demostraron un claro efecto antagónico de *Trichoderma* contra *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento.

2.4.2. Moho gris de *Eucalyptus*

Es una de las enfermedades más importantes en viveros forestales a nivel foliar. Los daños se visualizan por la cobertura de moho y vuelco de los ápices en toda la planta, en donde el agente causal es *Botrytis cinerea* *pers ex Fr.* El moho se manifiesta en condiciones de alta humedad y temperaturas medias (22-24 °C).

Es una enfermedad de difícil erradicación por las propias condiciones físicas de este tipo de establecimientos debido a la saturación de humedad de la atmósfera, y por la resistencia de este agente a productos químicos. Por lo tanto la estrategia imprescindible de control de la enfermedad es lograr un manejo integrado del agente consistente en la utilización de agentes químicos acompañado de manejos culturales como aireación apropiada del local; tratamientos sanitarios en herramientas, envases y sustrato; y control biológico.

Al respecto, ensayos realizados por Molina et al. (2006) con cepas de *Trichoderma* demostraron que éstas fueron efectivas como agentes de biocontrol al reducir significativamente la colonización y esporulación de *B. cinerea* en *Eucalyptus* en condiciones de vivero.

Por su parte Elad, citado por Mondino y Vero (2006) también demostró que cepas de *T. harzianum* T 39 eran efectivas en el control de *B. cinerea*. En el control de esta enfermedad el mecanismo más efectivo es el de la competencia por nutrientes, ya que *Trichoderma* es más eficiente en la movilización y captación de nutrientes de la rizósfera que *B. cinerea*. (Benítez et al., 2004).

2.4.3. Mancha foliar

Los problemas sanitarios ocasionados por patógenos de hoja son más significativos en vivero, ya que el viverista percibe que cada hoja dañada perjudica tanto el crecimiento como la colocación en el mercado de la planta.

El agente causal de esta enfermedad en viveros es *Alternaria tenuísima*, patógeno frecuente de semilla, y su patrón de infección es ascendente en la planta hacia las hojas que presentan en sus bordes manchas relativamente chicas color marrón rojizo.

Un adecuado nivel de nutrientes en macro y micronutrientes en el plantín es una medida apropiada de manejo de esta infección. Por otro lado, la inoculación con *Trichoderma* en plantas de tabaco y papa aumentó la tolerancia a esta enfermedad al inducir la producción de quitina en la pared celular de hojas atacadas por *Alternaria* spp. (Howell, citado por Benítez et al., 2004).

2.5. CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico se encuadra dentro de un manejo integrado de plagas que tiene como objetivo un tratamiento fitosanitario integral; y se define como la introducción artificial de organismos antagonistas en el patosistema, para controlar el patógeno y favorecer a la planta, reduciendo el inóculo del mismo y/o reduciendo la intensidad de los síntomas posteriores a la infección (Mondino y Vero, 2006).

Los conocimientos de las interacciones de los microorganismos entre sí, de los microorganismos con el vegetal, y la influencia del medio ambiente sobre ellos, permite definir estrategias para interferir en el desarrollo de la enfermedad y minimizar los daños en la planta (Mondino y Vero, 2006).

Estos conocimientos permiten optar por microorganismos con capacidad comprobada, a través de ensayos, para antagonizar o controlar a los patógenos de las plantas, generar resistencia a enfermedades en la misma y si es posible actuar como agente biopromotor del crecimiento.

En este marco se utilizan diversos criterios en el proceso de aislamiento del agente como: velocidad de crecimiento y de acción biológica sobre el patógeno; capacidad de colonización de raíces; resistencia a productos químicos antimicrobianos, para finalmente evaluar el comportamiento de la población del agente de control biológico y del patógeno en el ecosistema de manejo integrado de plagas (Serrano y Galindo, s.f.).

Diferentes microorganismos se han estudiado y caracterizado como agentes de biocontrol de determinados patógenos de planta, y como biopromotores del crecimiento. Uno de los organismos que ha sido estudiado y desarrollado, tanto como agente biocontrolador de hongos fitopatógenos como biopromotor del crecimiento en vegetales hasta obtener una fórmula comercial, ha sido dentro de los hongos filamentosos, la especie *Trichoderma harzianum*. Estas características, sus mecanismos de acción y la influencia de las mismas en los parámetros de calidad final del plantín serán descritas a continuación.

2.5.1. *Trichoderma harzianum*

Clasificación taxonómica:

- Reino: MYCETAE
- División: EUMYCOTA
- Subdivisión: DEUTEROMYCOTINA
- Clase: HYPHOMYCETALES
- Orden: HYPHALES (MONILIALES)
- Género: *Trichoderma*
- Especie: *Trichoderma harzianum*

Las colonias de *Trichoderma* presentan un color blanco al inicio, tornándose verde oscuro o amarillentas posteriormente. Se caracteriza por presentar conidióforos no verticilados y erectos, de color hialino. Los cuales exhiben derivaciones compactadas que forman anillos con un sistema de ramificación irregular, de forma piramidal. Estos poseen fiálides simples o en grupos, con forma de botella, hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. En los ápices de las fiálides es donde se forman los conidios o esporas sexuales, unicelulares subglobosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes.

En su estado vegetativo las colonias de *Trichoderma* presentan micelio o septas simples. Son anaerobias facultativas y se reproducen asexualmente por conidios. Forma clamidosporas intercaladas o raramente terminales, las cuales pueden ser de color verde o azules.

2.5.2. Biocontrol de fitopatógenos y biopromoción del crecimiento vegetal

por *Trichoderma harzianum*

Las cepas de *Trichoderma* son muy utilizadas como agentes de control biológico debido a su gran capacidad reproductiva, capacidad de sobrevivir en condiciones muy desfavorables, por la eficiencia en la utilización de los nutrientes, la capacidad para modificar la rizósfera, su fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos, y la eficiencia en la promoción de crecimiento vegetal y mecanismos de defensa (Benítez et al., 2004). Tienen la capacidad además, de crear un ambiente favorable al desarrollo radical lo que aumenta la tolerancia de la planta a diversos tipos de estrés (Infante et al., 2009).

2.6. BIOCONTROL POR *Trichoderma harzianum*

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades como agente biológico para controlar enfermedades causadas por patógenos fúngicos. Las especies de este género son las más utilizadas contra este tipo de patógenos por su ubicuidad, facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su rápido crecimiento en gran número de sustratos, y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas y Lumsden, citados por Ezziyyani et al., 2004).

Cabe agregar la capacidad de este antagonista para tolerar medios con contenidos significativos de pesticidas. Esta característica es importante en manejos integrados de plagas en los que se combina tanto productos químicos como biocontroladores frente a fitopatógenos.

Pero se debe puntualizar que el nivel de resistencia difiere entre cepas. Según Woo et al. (2005) la presencia de un gran número de proteínas efectivas para el transporte ubicadas en la membrana celular, es la razón principal que explica el alto

nivel de resistencia innata de estos hongos a una gran variedad de productos químicos y toxinas naturales producidas por otros organismos.

En cuanto a la eficacia de este agente biocontrolador, evaluaciones realizadas en el Departamento de Parasitología de la Universidad autónoma de Chapingo, Méjico, demostraron que *T. harzianum* protegió en un 100 % a plantas de ajitomate inoculadas con granos de trigo infestados con *R. solana* (García y Pérez, 2003). Además Cubillos et al. (2009) evidenció efectos antagonistas de este agente sobre *Fusarium oxisporum* y *Fusarium solana* en plantas de maracuyá; al igual que Harman, citado por Mondino y Vero (2006), los indica sobre *Botrytis cinerea* en uva.

Por otra parte, en trabajos realizados por Añón et al. (2004) en viveros forestales, se evidenciaron efectos promotores de este agente en el mejoramiento de la calidad de parámetros tanto morfológicos como fisiológicos de plantines de pinos.

El control biológico no es más que el resultado combinado de diferentes mecanismos que actúan sinérgicamente en el control de la enfermedad. Cuantos más mecanismos de acción manifieste un agente de biocontrol; más eficiente y duradero será el control sobre el patógeno, aspectos que no poseen los plaguicidas químicos (Infante et al., 2009).

2.6.1. Mecanismos de biocontrol

Los mecanismos de acción del género *Trichoderma* que actúan sobre el fitopatógeno son los siguientes: micoparasitismo, amensalismo, competencia por nutrientes y espacio, en cuanto a la interacción agente de control-patógeno; e inducción de resistencia en la interacción agente de biocontrol-hospedero. Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera del vegetal.

La acción de los mismos se analizarán a continuación haciendo énfasis, en el contexto de este trabajo, en la inducción de resistencia sistémica en el vegetal por el agente biocontrolador.

2.6.1.1. Micoparasitismo

Es la capacidad de un organismo de degradar y asimilar hongos, este mecanismo es utilizado por hongos biocontroladores. Trabajos realizados por Zeilinger et al., citados por Mondino y Vero (2006) demostraron que *Trichoderma harzianum* mediante producción de quitinasas, micoparasitaba *Rhizoctonia solani* en césped. Dicho proceso involucra las etapas de: quimiotropismo, reconocimiento, unión y penetración al hongo hospedero y finalmente asimilación del contenido celular.

Se cree que el proceso comienza a través la liberación en bajas dosis de quitinasas, glucanasas y proteasas por parte de *Trichoderma*, que degradarían las paredes del patógeno. Producto de esta acción éste libera oligómeros que inducen al ataque del antagonista, posteriormente *Trichoderma* envuelve al patógeno y libera metabolitos que facilitan la entrada de hifas en la luz del hongo parasitado y la asimilación del contenido de la pared (Benítez et al., 2004).

2.6.1.2. Amensalismo

Es la producción por parte del antagonista de metabolitos inhibitorios o tóxicos para el fitopatógeno. Se pueden mencionar antibióticos, enzimas degradadoras de las paredes de los hongos y toxinas killer. En este ítem se detallarán las dos primeras.

En el caso de la antibiosis, son los productos del metabolismo secundario del agente los capaces de inhibir el desarrollo o generar la muerte del patógeno. Vey et al., citados por Mondino y Vero (2006) demostraron la capacidad de *Trichoderma* spp. de

producir elementos antibióticos activos contra fitopatógenos fúngicos, como gliotoxinas, gliovrinas, viridinas y pironas, entre otras.

La acción de estas sustancias se basa en alterar la permeabilidad iónica de la membrana celular del patógeno promoviendo desequilibrios osmóticos internos que llevan a desordenes intracelulares, comprometiendo su desarrollo.

Por otra parte se indica que la habilidad del biocontrolador también radica en liberar en la rizósfera tanto sustancias antibióticas como enzimas hidrolizadoras de la pared, ya que se ha comprobado que esta acción combinada es más eficiente, en el control de patógenos, que la actividad de liberación de estas sustancias por separado (Howell, citado por Barrios, 2006).

De acuerdo a observaciones realizadas por Ochoa (2002), diversas cepas de *Trichoderma* tuvieron actividad antifúngica a través del efecto antibiótico de quitinasas y glucanasas sobre micelios de *Mycosphaerella fijiensis*.

En la producción de enzimas degradadoras de pared, la pared celular de los hongos está formada por quitina, glucanos y proteínas. Como esta pared es trascendente para su supervivencia, la producción de enzimas hidrolizadoras de estos compuestos por parte del agente de biocontrol es una de las estrategias posibles para frenar el desarrollo del fitopatógeno

A estas enzimas se las denomina proteína-PR y son moléculas que se sintetizan y acumulan en las células vegetales en situaciones de patogénesis o por inducción de microorganismos no patogénicos. De todas maneras pueden encontrarse en los tejidos independientemente de infecciones.

Sus funciones son variadas, las formas básicas de estas moléculas acumuladas en la vacuola es la mencionada en el párrafo anterior consistente en la destrucción de células del patógeno una vez que este logró penetrar en la célula. Las formas ácidas son secretadas al espacio extracelular y son responsables de la liberación de elicitores de la pared del hongo induciendo de esta manera la activación de genes de defensa (Neuhaus, Kasprzewska, citados por Moreno, 2006).

Según estudios realizados por Schirmbock et al., citados por Mondino y Vero (2006), el género *Trichoderma* es capaz de producir quitinasas, glucanasas y proteasas. Investigaciones realizadas por Ezziyyani et al. (2004) demuestran la efectividad de *T. harzianum* para reducir *in Vitro* colonias de *Phytophthora capsici*, fuente causal de la podredumbre del pimiento, al producir β -1,3-glucanasa enzima hidrolítica de la pared celular.

2.6.1.3. Competencia

En este mecanismo de control no hay acción directa del antagonista sobre el fitopatógeno, sino que ambos compiten por el espacio y por los nutrientes. Entonces para que el antagonista sea efectivo como competidor, deberá principalmente ser capaz de adaptarse mejor y más rápido al nicho a competir, y a utilizar nutrientes a bajas concentraciones

Como se había mencionado anteriormente, *Trichoderma* tiene una capacidad superior de movilizar y captar nutrientes del suelo en comparación con otros organismos, característica que se utiliza principalmente para controlar a *Botrytis cinerea*. Esto se debe a la capacidad de *Trichoderma* para obtener moléculas de ATP a partir de diferentes azúcares abundantes en la rizósfera como celulosa, quitina y glucanos (Chet et al., citados por Benítez et al., 2004).

Trichoderma también tiene la capacidad, mediante la producción de altas cantidades de sideróforos, de captar el hierro de la rizósfera deteniendo el crecimiento de otros hongos (Benítez et al., citados por Barrios, 2006). Esta acción la detalla aún más Hernández et al. (2006) indicando que un modo de competencia entre microorganismos rizosféricos es la eficacia de utilización de estos sideróforos, que son pigmentos extracelulares que secuestran rápidamente el Fe del medio, convirtiendo a este metal en un factor limitante para otros organismos.

De todas maneras, afirma el autor, las plantas no solo no se ven perjudicadas por esta acción, sino que se ven favorecidas al incorporar a su nutrición el Fe solubilizado en los complejos férricos por los sideróforos fúngicos.

Por otra parte en ensayos realizados por Altomare et al., citados por Chávez (2006) se reportó que tanto *Phytium* spp. como *Rhizoctonia* spp. son incapaces de solubilizar fósforos, lo que otorga a *Trichoderma* una ventaja competitiva en la supresión de estos patógenos.

Otro aspecto importante en la competencia por nutrientes sería la eficacia de *Trichoderma* frente a otros hongos en el transporte de glucosa (Delgado et al., citados por Benítez et al., 2004)

2.6.2. *Trichoderma harzianum* como inductor de resistencia

Las plantas poseen mecanismos de defensa denominados constitutivos que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos como ser presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, acumulación de compuestos tóxicos, etc. En cambio la inducción de mecanismos de resistencia a enfermedades, se activa por la mediación de sistemas de reconocimiento específicos por los cuales la planta reconoce el ataque de un patógeno (Hutcheson, citado por Madriz, 2002).

En relación a lo anterior, la capacidad de resistir una enfermedad o adquirirla en la interacción planta-patógeno puede ser de dos tipos: compatible cuando ocurre enfermedad, e incompatible cuando la planta resiste. En esta última la planta puede percibir la presencia del patógeno mediante dos mecanismos diferentes.

El primero se basa en la teoría gen por gen, la cual propone la interacción física entre un producto codificado por un gen de resistencia (*R*) de la planta con el producto de un gen de avirulencia (*avr*) del patógeno, activándose a tiempo mecanismos de resistencia en la planta que impiden la aparición de la enfermedad. Este tipo de asociación es altamente específica y complementaria a nivel de la planta y el patógeno, causando generalmente una reacción de tipo hipersensible, con muerte celular generalizada que detiene el desarrollo de la infección.

El segundo mecanismo está determinado por el reconocimiento de compuesto o inductores de naturaleza química diversa, que son secretados por el patógeno o por la propia planta en la interacción con este, y que son reconocidos por receptores de membrana de las células vegetales, generando la activación de mecanismos de defensa. Este tipo de interacciones no es específico a nivel de especies o subespecies entre genes específicos y complementarios (Saucedo y Gavilanes, 2005). En el contexto de este trabajo se hará énfasis en este tipo de mecanismos de inducción de resistencia, ya que es el utilizado en la interacción con el vegetal por el agente biológico en cuestión.

Los mecanismos generales de defensa inducidos en el vegetal como consecuencia del reconocimiento entre genes vegetales y patógenos, o por reconocimiento de inductores son los siguientes: muerte celular por reacción hipersensible, acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, acumulación de enzimas hidrolíticas, y deposición de sustancias reforzadoras de la pared celular vegetal entre otros; que pueden actuar en conjunto para detener el avance del patógeno (Collinge et al., citados por Madriz, 2002).

Estos mecanismos pueden dividirse en resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida, diferenciándose ambas por el tipo de inductor, el tipo de respuesta y el tipo de señal que coordina la respuesta de resistencia a distancia

2.6.2.1. Resistencia sistémica adquirida

En la resistencia sistémica adquirida, la respuesta del vegetal puede ser activada por la interacción con patógenos que causen una lesión, por respuestas de hipersensibilidad o por metabolitos liberados por el propio patógeno. Este tipo de resistencia esta asociada a una alta producción de genes PR (Hammerschmidt, citado por Madriz, 2002) que codifican para una familia de proteínas-PR relacionadas con la patogénesis. Así como a la producción de fitoalexinas, formación de barreras estructurales, compuestos antimicrobianos, etc, que se analizarán más adelante en este trabajo.

Los genes arriba mencionados codifican la síntesis de proteínas PR como por ejemplo enzimas quitinasas y β -1.3-glucanasas. Estas se acumulan en las plantas después y durante la infección. Se caracterizan por un bajo peso molecular, resistencia a la proteasa, y estar localizada extracelularmente. Tienen la función, particularmente las enzimas mencionadas, de hidrolizar la pared celular fúngica ya que esta contiene β -1.3-glucano y quitina, inhibiendo por consiguiente el desarrollo de estos organismos.

2.6.2.2. Regulación hormonal en resistencia sistémica adquirida

La manifestación de resistencia de manera sistémica en el vegetal implica la existencia de algún sistema de señales capaces de transmitirse a través de los tejidos. Investigaciones realizadas indican que la activación de estos mecanismos en la planta esta regulada por una serie de inductores químicos en los cuales se destaca la actividad del ácido salicílico en la regulación sistémica y también local de este proceso

Sin embargo el papel de esta molécula como la responsable principal de la regulación de la resistencia sistémica en el vegetal es cuestionado. En investigaciones realizadas por Vernooij et al., citados por Moreno (2006) con mutantes deficientes en acumulación de ácido salicílico, se observó que la resistencia sistémica se seguía desarrollando.

Continuando con el mismo trabajo, se comprobó inclusive que se necesitaron niveles elevados de este ácido para que se observe resistencia sistémica en hojas. De todas maneras su acumulación es indispensable como mediador de varias respuestas de defensa.

2.6.3. Resistencia sistémica inducida

El mecanismo de resistencia inducida se basa en que las plantas contienen información genética para la resistencia contra las enfermedades. Hay agentes de biocontrol que pueden provocar que se activen este mecanismos previo a la infección por un patógeno, estimulándose entonces una respuesta de resistencia por períodos extendidos en tejidos y órganos, que se hará efectiva cuando el vegetal este en presencia del patógeno.

Una hipótesis para explicar la bioprotección mediante estos agentes ha sugerido que un bajo nivel de expresión de genes relacionados con la defensa podría ser suficiente para que las respuestas primarias de defensa de la planta actúen eficientemente contra subsecuentes ataques patogénicos (Rodríguez, 2005).

La inducción de resistencia esta demostrada por numerosos trabajos, uno de ellos realizado por Ezziyyani et al. (2005) comprueba que, si bien plantas de pimiento infestadas por *Phytophthora capsici* presentaron necrosis en los tejidos, el avance de la

enfermedad se ralentizó en plantas tratadas con *T. harzianum*, lo que significa una reducción del avance del patógeno mediada por una inducción de resistencia.

Este tipo de mecanismo motivado por *Trichoderma* en cuanto al biocontrol de fitopatógenos, se considera actualmente el más importante en comparación con los ya vistos anteriormente como el micoparasitismo y la competencia (Benítez et al., citados por Woo et al., 2005). Es decir, es apoyada cada vez más la hipótesis de que es la inducción de resistencia y no la capacidad antagónica de *Trichoderma*, el mecanismo detrás de algunas de las mejores variedades comerciales utilizadas de este agente en todo el mundo como productos fitosanitarios.

Tanto la resistencia adquirida como la inducida pueden iniciarse como respuesta a una herida local, desarrollándose subsiguientemente en forma sistémica en toda la planta, protegiendo por lo tanto no solo el sitio donde ocurrió la inducción, sino también lugares alejados del mismo (Woo et al., 2005).

Como se mencionó, esta reacción sistémica inducida por agentes biológicos es estudiada en numerosas investigaciones, artículos como el realizado por Harman et al., citados por Mondino y Vero (2006), indicaron que *T. harzianum* es activo contra fitopatógenos de la parte aérea ya que mediante la colonización radicular, induce la resistencia sistémica contra ataques en otras zonas de la planta.

A su vez, Ezziyyani et al. (2005) detectaron mediante ensayos que el tratamiento con *T. harzianum* en las raíces de pimiento produce una reacción sistémica a nivel de hojas a pesar de que las mismas no han sido afectadas por el antagonista ni por el patógeno.

2.6.3.1. Mecanismos de reconocimiento y activación

Según Madriz (2002), recientemente se reafirmaron modelos que explican los mecanismos moleculares de reconocimiento basados en la generación de una cascada de reacciones de defensa. Estas son activadas por la interacción y reconocimiento de receptores transmembranarios codificados por genes *R* de la planta, con ligandos codificados por genes *avr* del patógeno como quitinasas o glucanasas.

También se puede activar estas reacciones de defensa por la acción de inductores (elicitors en inglés). Estos compuestos se unen a receptores de membrana de la célula vegetal y pueden estimular en la planta una respuesta similar a la que provocaría el patógeno, induciendo de esta manera mecanismos de resistencia en el vegetal en ausencia de aquel.

La naturaleza química de estos inductores es variada, indicándose ácidos grasos, glicoproteínas, proteínas, péptidos, oligosacáridos, lípidos, liproteínas, etc. Se pueden encontrar elicitores exógenos de origen patógeno y elicitores de origen endógeno resultado de la liberación de fragmentos de pared celular del hospedante producto de la interacción primaria con el patógeno (Riveros et al., 2004).

El primer tipo de elicitores citado en el párrafo anterior, lo pueden constituir por ejemplo cepas no patogénicas de *Trichoderma*. La actividad de enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas producidas en este caso por el vegetal, liberan componentes (como oligosacáridos) de la pared celular del hongo, que tienen un efecto inductor de defensa en los tejidos vegetales (Madriz, 2002).

Estudios realizados sobre *Trichoderma* en sistemas rizosféricos demostraron que este agente biológico es capaz de producir al menos tres tipos diferentes de

inductores, registrándose péptidos o enzimas, proteínas *avr*, y fragmentos de pared celular como oligosacáridos de bajo peso molecular (Woo et al., 2005).

Enzimas hidrolíticas, como quitinasas y glucanasas, son producidas y utilizadas por *Trichoderma* en mecanismos antagónicos en la rizósfera. Por lo tanto se cree que la planta es capaz, mediante el uso de receptores específicos de la membrana, de captar esta sobre acumulación de proteínas de defensa en el medio como resultado de la lucha antagónica entre patógenos (Woo et al., 2005).

El reconocimiento de estos componentes culmina en la rápida activación de genes de defensa, con la consiguiente producción y acumulación celular de diversos compuestos con actividad microbiana.

Más allá de que fragmentos de pared del hongo, producto de hidrólisis por acción de enzimas vegetales, actúen como inductores de defensa. Nueva investigaciones indican que los oligosacáridos antes mencionados pueden elaborarse sintéticamente en el laboratorio, y ser inoculados bajo la raíz y superficie de hojas induciendo resistencia.

Esta biotecnología proporciona una nueva posibilidad, al poder utilizar estos metabolitos como inductores exógenos semi sintéticos, más que el hongo en sí, para generar resistencia sistémica (Woo et al., 2005).

Cabe aclarar sin embargo que si bien los elicitores inducen la activación de respuestas de defensa en la planta, no necesariamente llevan a generar resistencia. Esta característica distingue a los elicitores de genes de avirulencia *avr* de patógenos, que confieren resistencia mediante reconocimiento específico del producto de un gen *R* correspondiente a la planta como se indicó anteriormente (Dangl y Jones, citados por Moreno, 2006).

En este sentido De Wit, citado por Madriz (2002) aclara que los genes R del vegetal tampoco son en sí responsables directos de la resistencia, pero tienen una función determinante en la especificidad del reconocimiento, actuando como iniciadores de la defensa.

Se llegó a este concepto porque se determinó, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos inferida a partir de los genes R, rasgos distintivos comunes a la mayoría de las proteínas-PR, siendo uno de ellos la presencia de repeticiones ricas en leucinas (LRR). La variabilidad observada en la secuencia de aminoácidos de estas LRR, se cree confiere la especificidad del reconocimiento (Ellis et al., citados por Madriz, 2002).

Profundizando a nivel molecular, la resistencia en el vegetal es consecuencia del incremento en la producción de metabolitos y enzimas como la fenilalanina amonioliasa (PAL), chalcone sintasa (CHS) y chalcone isomerasa (CHI).

Estas enzimas están involucradas en la síntesis de fitoalexinas, y éstas a su vez inducen genes que codifican para la producción de enzimas mencionadas. Además están asociadas a la síntesis de las ya mencionadas proteínas-PR relacionadas con la patogenicidad como quitinasas y glucanasas (Benítez et al., citados por Barrios, 2006).

Incluso investigaciones realizadas por Benítez et al. (2004) en este sentido han revelado que la expresión específica de la quitinasa de *T. harzianum* en plantas de tabaco y papa resultaron en líneas transgénicas altamente tolerantes o completamente resistentes a *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, y *Rhizoctonia solana*.

Se deduce entonces, según el autor que la protección de plantas parece ser resultado exclusivamente del incremento en la actividad enzimática de esta enzima, ya que en otros casos, la expresión de pectinasas y glucanasas en planta resultaron en un

refuerzo enzimático contra patógenos pero no en una estimulación específica de mecanismos de resistencia (Benítez et al., 2004).

2.6.3.2. MAP quinasas

La modificación post-transduccional de proteínas tiene un papel determinante en las diferentes cascadas de señalización antes indicadas. Según Clark et al., citados por Ortiz (2007), el proceso de fosforilación/defosforilación de proteínas por proteínas quinasas/fosfatasa esta implicado en la mayoría de las rutas de señalización.

De estas proteínas quinasas, una de las categorías más importantes es la de las MAP quinasas (MAPK en inglés). Estas moléculas de señalización se encuentran distribuidas tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células, participando de distintas rutas de transducción (Mishra et al., citados por Ortiz, 2007).

Estas moléculas son activadas por un amplio espectro de señales asociadas a la defensa, entre las que se encuentran hormonas vegetales como el etileno, el ácido salicílico; así como por especies reactivas de oxígeno (Nakagami et al., citados por Ortiz, 2007).

Parte del estrés de origen biótico como el originado por patógenos y elicitores derivados del mismo, y de origen abiótico como bajas temperaturas, oxidación, etc, pueden inducir en las plantas respuestas de defensa a través de rutas de MAP quinasas (Mishra et al., citados por Ortiz, 2007). Por tanto las MAPKs actúan como puntos de convergencia en la señalización del estrés.

Haciendo alusión al concepto anterior, el tratamiento de protoplastos de *Arabidopsis* con el elicitor FLS2 de la bacteria *flagella*, da lugar a la activación de una cascada de MAP quinasas, otorgando resistencia frente a bacterias y hongos (Asai et al.,

citados por Ortiz, 2007). Esto sugiere según el autor que la señalización iniciada por diferentes patógenos converge dentro de una misma cascada de MAPKs.

La finalidad de estas proteínas MAP quinasas la explican Pearson et al., citados por Ortiz (2007), cuando mencionan que las células reciben distintos estímulos del entorno, estas MAPKs actúan como sistema de transducción de señales, transfiriendo la información desde los receptores que reciben el estímulo hasta la diana efectora que generará una respuesta genética ante ese estímulo, controlándose así funciones celulares de defensa.

Un caso de señalización en resistencia inducida trabajado por Brodersen et al., citados por Ortiz (2007) indica que la MAP quinasa AtMPK4 tiene una función esencial en la represión de la resistencia sistémica adquirida, así como es responsable de la inducción de genes de defensa (EDS1 y PAD4) por el ácido jasmónico/etileno

En concordancia con el estudio anterior, Andreasson et al., citados por Ortiz (2007) identificaron una MKS1 como sustrato de AtMPK4. MKS1 actúa de nexo entre esta MAP quinasa y factores de transcripción. Además agrega que la sobreexposición de MKS1 es suficiente para activar la resistencia dependiente del ác. salicílico, pero no interfiere en la inducción de los genes de defensa por el ác. jasmónico.

Estos conceptos son una muestra de las complejas interconexiones moleculares de estas tres hormonas en la regulación de la defensa, a través de activación de rutas diferentes o rutas que se entrecruzan parcialmente. La relación entre estas hormonas en la regulación de la resistencia inducida se analizará a continuación.

2.6.3.3. Regulación hormonal en resistencia sistémica inducida

Estos mecanismos de defensa en el caso de resistencia inducida ya no son dependientes del ácido salicílico, como sí lo eran en resistencia adquirida. Sino que dependen hormonalmente del etileno y el ácido jasmónico (Abeles, Pieterse, Sticher, citados por Shores et al., 2004).

La combinación de estas dos hormonas es necesaria para inducir la expresión de ciertos genes de defensa, genes que no son inducidos por el ácido salicílico (Penninckx et al., citados por Moreno, 2006).

Los elicitores antes mencionados liberados por *Trichoderma* estimulan receptores para el etileno y el ácido jasmónico presentes en la planta a nivel de raíz. Estos se volatilizarían siendo captados por tallos, hojas y demás órganos de la planta, activando la transcripción de genes de resistencia para el desarrollo de una defensa sistémica.

Una de las condiciones para que estas dos hormonas actúen, es la baja concentración del ácido salicílico en el sistema. Esto demuestra que las vías de señalización del ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico no actúan aisladamente a través de cascadas lineales de inducción, sino que están interconectadas. Por ejemplo se sabe que la inducción de resistencia sistémica adquirida vinculada al ácido salicílico, tiene un efecto negativo en las vías del ácido jasmónico y el etileno (Moreno, 2006).

En estudios realizados en plantas de *Arabidopsis thaliana*, se ha visto que plantas mutantes incapaces de producir ácido salicílico, produjeron 25 veces más ácido jasmónico que las salvajes, y mostraron un aumento en la expresión de genes regulados por éste ácido en respuesta a la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (Moreno, 2006).

Este concepto de interacción compleja entre estas tres hormonas lo indica también Glazebrook et al., citados por Ortiz (2007) al afirmar que en muchas ocasiones existe una interacción negativa entre las rutas de señalización del ácido jasmónico/etileno y el ácido salicílico dando lugar a un patrón de expresión de genes antagónico.

La capacidad de regular diferencialmente las respuestas de defensa inducidas tanto por el ácido salicílico como por la combinación del ácido jasmónico y etileno según las diferentes señales, pertenece a un gen denominado NPR1. Éste crea una proteína reguladora que se encuentra en el citoplasma de la célula.

En situaciones de inducción se transloca al núcleo donde interacciona con factores de transcripción involucrados en el establecimiento de resistencia sistémica adquirida e inducida, mediando además en las interconexiones mencionadas anteriormente entre las vías de señalización de estas tres hormonas (Pitterse et al., Kinkema et al, citados por Moreno, 2006).

A su vez Benedetti et al., citados por Ortiz (2007) señala que algunas de las respuestas dependientes del ácido jasmónico requieren del gen COI 1. Éste codifica una proteína F-Box que forma parte de una ligasa que etiqueta represores de este ácido para que sean degradados en el proteosoma (Devoto et al., citados por Ortiz, 2007).

Otro ejemplo de regulación nos lo brinda Diallinas y Sticher, que comprobaron que el gen que codifica la producción de fenilalanina amonioliasa es activado por el ácido jasmónico y el etileno. Esta enzima es la primera en la vía de biosíntesis de fenilpropanoides, precursores de la lignina y fenoles (Shoresh et al., 2004), utilizados en el reforzamiento celular.

También Shoresh et al. (2004) en investigaciones sobre vegetales inoculados con *Trichoderma* halló que usando inhibidores de estas dos hormonas descendía

considerablemente el efecto protector de este agente en la planta. Estos resultados sugieren, según el autor, la participación hormonal del ácido jasmónico y el etileno en la resistencia inducida mediada por *Trichoderma*.

2.6.4. Peroxidasas

Como se ha demostrado, *T. harzianum* es capaz de inducir reacciones de resistencia en la interacción con el vegetal, generando una actividad transcripcional de genes de defensa que codifican la síntesis de metabolitos microbianos y proteínas.

Si bien este tipo de resistencia se caracteriza por no estar asociada a la producción de proteínas-PR como glucanasas y quitinasas, de todas maneras induce la síntesis de otro tipo de proteínas con actividad óxido-reductasa que originan especies reactivas de oxígeno ROS (por sus siglas en ingles).

Estas especies reactivas se generan durante la patogénesis de manera característica en apoplastos fuera de la membrana plasmática de las células vegetales (Doke y Ohashi, citados por Benezet et al., 2008). Se han postulado dos mecanismos enzimáticos como los responsables de esta producción.

El primero involucra a la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática, que según Torres et al., citados por Benezet et al. (2008) se considera la principal fuente de ROS en respuesta a varios patógenos.

El segundo mecanismo esta formado por peroxidasas de la pared celular, las cuales contribuyen a la producción apoplástica de ROS según Boldwel et al., citados por Benezet et al. (2008) en algunas interacciones planta-patógeno.

Soylu et al., citados por Benezer (2008) afirman que ambos mecanismos enzimáticos pueden producir estas especies reactivas de oxígeno en diferentes contextos espacio/temporales, lo que sugiere una diferencia funcional entre ROS producidas fuera de la célula vegetal.

Las peroxidasas en la célula vegetal se encuentran dentro de organelos llamados peroxisomas, alojándose estas dentro de los cloroplastos y liberadas posteriormente en el proceso infeccioso. Estas enzimas, en vegetales, se caracterizan por ser glicoproteínas monoméricas que contiene dos iones calcio y 4 puentes disulfuro.

Estudios realizados por Ezziyyani et al. (2005) demuestran que la adición de *T. harzianum* a plantas de pimiento inoculadas con *Phytophthora capsici*, genera una reacción defensiva con producción de proteínas con actividad peroxidasa. El autor expone que componentes del micelio de *Trichoderma* actuaron como elicitores de la reacción defensiva en el vegetal. También Obradith et al. (2009) hallaron que *T. harzianum* induce actividad peroxidasa en frutos de lulo (*Solanum quitoense* L.).

Este tipo de proteínas con actividad peroxidasa no presentan por sí mismas actividad antifúngica, pero están involucradas en la respuesta a enfermedades. Esto se debe a que tienen un papel fundamental en los procesos de endurecimiento de la pared celular, ya que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos como las quinonas, producidos como respuesta al ataque del patógeno, para la formación de lignina provocando así un aumento de la resistencia de la pared a la infección.

A parte del proceso de lignificación por esta vía, cabe señalar que también hay reforzamiento de la pared celular por acumulación y entrecruzamiento de proteínas estructurales de pared como hidroxiprolina, glicina y prolina; además de deposición de resina en los espacios intercelulares. Estas alteraciones tienen como objetivo aislar al

patógeno e impedir el flujo de nutrientes y agua provenientes de las células vecinas (Moreno, 2006).

Por otra parte las peroxidasas se involucran en procesos oxidativos de la superficie celular generando derivados reactivos del oxígeno, dando lugar a lo que se denomina un “estallido oxidativo” en el sistema. Estas especies reactivas de oxígeno son el peróxido de hidrógeno y radicales libres como al unión superóxido y el radical hidroxilo.

El oxígeno molecular por su estructura electrónica estable es relativamente no reactivo y no tóxico par a los organismos aeróbicos. Pero una vez que se altera su distribución electrónica reaccionan fácilmente ante cualquier molécula, pudiendo de esta manera alterar sistemas biológicos (García et al., 2004).

Estas especies reactivas de oxígeno tienen un alto grado de toxicidad para los organismos. Actúan como compuestos antimicrobiales, como inductores de muerte celular severa en el sitio de infección, o sea en el tejido que esta directamente en contacto con el patógeno característico de reacciones de hipersensibilidad HR, y más débil a nivel sistémico en tejidos no infectados.

2.6.5. Regulación de especies reactivas de oxígeno

Las señales de producción de ROS en el sistema vegetal esta mediada principalmente por la activación e incremento del flujo de calcio en la membrana celular y por la modulación de transducción de estas señales a través de proteínas de unión a calcio como las calmodulinas (Grant y Loake, citados por Soto et al., 2006). Estas proteínas después de unirse al calcio pasan a una vía NADPH quinasa dependiente que finaliza en la producción de ROS (Grant y Loake, citados por Soto et al., 2006).

Estas especies reactivas de oxígeno intervienen además en la activación de genes de defensa al estimular la liberación, desde el citosol al núcleo, del gen NPR1 mencionado anteriormente, interactuando en este proceso con el ácido salicílico (Mou et al, citados por Benezzer et al., 2008).

Estudios realizados por Desikan et al., citados por Benezzer et al. (2008) en células de *Arabidopsis* tratadas con peróxido de hidrógeno observaron cambios en el perfil de expresión de 175 genes de 11.000 analizados. Estos genes codifican para enzimas antioxidantes, proteínas-PR o proteínas con función de señalización como las cinasas, o factores de transcripción.

2.6.5.1. Peróxido de hidrógeno

Cuando las respuestas de defensa se activan en la planta, la producción de peróxido de hidrógeno generadora de muerte celular muestra un comportamiento bifásico. Hay una acumulación inicial rápida de peróxido (fase I) es seguida por una segunda y más prolongada producción de peróxido (fase II).

Este comportamiento se ha observado para interacciones de incompatibilidad con el patógeno, o sea que causan infección. Pero para interacciones compatibles se observó que solo se da el primer pico de peróxido de hidrógeno.

Por lo tanto para Baker y Orlando, citados por Benezzer (2008) la fase I es una reacción biológicamente inespecífica, mientras que la fase II requiere de la acción de genes avr del patógeno durante la interacción específica entre patógeno y planta.

De todas maneras el peróxido de hidrógeno además de ser considerado un metabolito celular tóxico, tiene como principal función según García et al. (2004), la de transmitir las señales exteriores derivadas de estímulos de origen ambiental y biótico al

interior de la célula ya que puede difundir a través de la membrana a diferencia de de otras ROS. Además, agrega el autor, interviene en la modulación de varios genes relacionados con la resistencia en el vegetal, y puede oxidar metales como el Fe a través de la reacción de Fenton produciendo radicales hidroxilos.

El primer concepto del párrafo anterior esta demostrado por Bowler y Fluhr, citados por Camarena y De la Torre (2007), éstos indican que el peróxido de hidrógeno probablemente sea un mediador entre diferentes vías metabólicas, además de una molécula señal que contribuye al fenómeno de tolerancia cruzada, en la cual las plantas expuestas a un estrés ofrecen protección a otro factor. Por ejemplo la exposición al estrés por calor induce la tolerancia a un ataque posterior de patógenos (Vallélian et al., citados por Camarena y De la Torre, 2007).

Levine et al., citados por Camarena y De la Torre (2007) también observaron en soja, que el peróxido induce la expresión de genes que codifican la producción de enzimas relacionadas con la defensa como la glutathione peroxidase y glutathione-S-transferase.

2.6.5.2. Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es el derivado reactivo del oxígeno más tóxico que se produce en el vegetal. Este metabolito degrada los ácidos grasos no saturados de la membrana de gran importancia biológica por ser los constituyentes principales de la membrana celular. Por tanto es una molécula importante utilizada contra la infección causada por fitopatógenos (García et al., 2004).

2.6.5.3. Radical anión superóxido

Por otro lado el radical anión superóxido tiene la capacidad de reaccionar con los lípidos de la membrana plasmática, generando daños irreversibles a esta estructura.

Este radical puede actuar como oxidante o reductor, por consiguiente, es capaz de oxidar una gran variedad de moléculas orgánicas. Además puede transformarse en peróxido de hidrógeno (García et al., 2004).

La acumulación en el sistema vegetal de estas especies reactivas además de la función oxidativa celular, representa en si misma, una vía de señalización para el inicio de la respuesta sistémica en la planta (Soto et al., 2006).

2.6.5.4. Homeostasis redox

Estas ROS como ya se mencionó hacen daño no solo a células del patógeno sino también a las propias células vegetales cuando se acumulan en cantidades indeseables, por tanto naturalmente son controlados por compuestos antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos.

Los primeros están compuestos por ascorbatos, flavonoides, carotenoides, glutatión, entre otros, que eliminan directamente al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su acción antioxidante intrínseca (Halliwell, citado por Benezer et al., 2008).

Los compuestos enzimáticos incluyen a superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y catalasa. La primer enzima actúa transformando el oxígeno en peróxido y las tres enzimas restantes lo detoxifican subsecuentemente hasta obtener agua (Benezer et al., 2008).

Pero en caso de ataque de patógenos para que estas especies reactivas se puedan acumular en las células vegetales, estos compuestos antioxidantes deben ser inhibidos temporalmente. Esta función de homeostasis redox la realiza el ácido salicílico que inhibe tanto la transcripción como la actividad de la catalasa al unirse directamente a

esta enzima según comprobó Horvath et al., citados por Palma (2009) en experimentos *in vitro* sobre *Arabidopsis thaliana*. Por tanto este ácido también es importante para regular el balance entre producción de ROS y sistemas antioxidantes (Palma, 2009).

Se puede agregar que según Riveros et al. (2004), en casos de inducción de mecanismos de defensa con producción de niveles indeseables de ROS debido a agentes biológicos en viveros forestales, este incremento puede regularse con la incorporación externa de cationes (Ca, Mn y Zn) en el sustrato. Estos cationes atrapan y reducen los radicales libres que se acumularon en el sistema vegetal en la espera del ataque del patógeno.

2.7. BIOPROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

POR *Trichoderma harzianum*

La colonización de las raíces por *Trichoderma* mejora el crecimiento, desarrollo y captación de nutrientes en el vegetal. Esto redunda en la calidad del plantín en general, y en el aumento de resistencia a enfermedades en particular. Se ha demostrado que este agente produce factores de crecimiento como auxinas, citoquininas, etileno y ác. acético entre otros, además de moléculas similares a las giberelinas como indica Osiewacz, citado por Benítez et al. (2004), que promueven y regulan el desarrollo y crecimiento del plantín.

Según Valencia et al., citados por Cubillos et al. (2009) estas sustancias producidas por *T. harzianum*, actúan como catalizadoras de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular, esto consigue que la planta se desarrolle más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con este agente.

Se han realizado trabajos que indican a *T. harzianum* como efectivo biopromotor del crecimiento, Cubillos et al. (2009) demostraron el potencial de este agente como estimulador *in vitro* en semillas de maracuyá, aumentando la velocidad de germinación y el porcentaje de germinación de las mismas. La estimulación del metabolismo de las semillas mediante el tratamiento con *Trichoderma* tiene la ventaja de que con el mismo, los plantines tienden a presentar mayor uniformidad en sus dimensiones y por lo tanto en la calidad final del material (Carneiro, citado por Cópola et al., 2000).

Continuando con el trabajo de Cubillos (2009), se observaron aumentos significativos en longitud y grosor del tallo de las plantas producidas, así como en la longitud de la raíz, mayor producción de hojas verdaderas y aumento del peso seco total. Particularmente el crecimiento en la biomasa radical no solamente beneficia al vegetal, también aumenta la disponibilidad propia de nutrientes para el biopromotor, ya que se acrecientan los exudados de raíz.

Por otra parte, la evaluación mencionada en capítulos anteriores sobre plantas de ajítomate, realizada por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma de Chapingo, evidenció que *T. harzianum* promueve el crecimiento, ya que se incrementó la altura y biomasa seca de estas plantas hasta en un 320%. Así como Ezziyyani et al. (2005) hallaron que las semillas de pimienta inoculadas con *T. harzianum* incrementaron el porcentaje de germinación y el peso seco de las plantas.

Otros trabajos como los de Contreras et al. (2009) comprobaron el efecto beneficioso de *Trichoderma harzianum* sobre el sistema radicular, hallando que las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con este agente aumentaron su volumen de raíces laterales de 4 a 6 veces. A través de la utilización de marcadores moleculares en estos ensayos los autores sugieren que *Trichoderma* estimula la expresión de genes que

regulan la producción de auxinas, hormonas importantes en la producción de raíces laterales.

2.7.1. Balance hormonal

Como se ha mencionado anteriormente este agente biológico produce factores de crecimiento como auxinas, citoquininas, etileno y ác. acético entre otros, que se volcarán al ambiente rizosférico y tendrán sus efectos positivos en el crecimiento vegetal. Sin embargo en algunos casos este efecto benéfico esta en cuestión, ya que algunos genotipos vegetales no reaccionan de la manera esperada ante el incremento local de estas hormonas en la rizósfera.

En este ítem se revisarán por tanto, los efectos que sobre el desarrollo y la calidad del plantín tiene un potencial desbalance hormonal debido a una acumulación local de ciertas hormonas producidas posiblemente por *Trichoderma harzianum* en la rizósfera.

Cabe aclarar que este estudio se realiza a partir de la observación de malformaciones en la base de raíces conocidas con el nombre de “agallas”, y el bajo volumen de raíces laterales de aquellos plantines de *E. dunnii*, si bien en un bajo porcentaje, que fueron inoculados con *T. harzianum*.

Se profundizará además como influye una sobre acumulación local de citoquininas en la sobre estimulación de la división celular en el tejido radicular. Y como este desbalance hormonal en desmedro de las auxinas genera dificultades en el ciclo de división celular, produciéndose por esta causa la generación de tumores o agallas en la corona de la raíz. Conjuntamente se estudiará como este desbalance hormonal a favor de las citoquininas y en desmedro de las auxinas inhibe el desarrollo de raíces laterales.

2.7.1.1. Citoquininas y el ciclo de división celular

Las citoquininas están involucradas en la regulación de procesos fisiológicos y de desarrollo de los vegetales, entre los que se incluyen la estimulación de la división celular, la morfogénesis de tallos y raíces, la senescencia de la hoja, la movilización de nutrientes, la dominancia apical, la formación y actividad de los meristemos del ápice caulinar, el desarrollo floral, la ruptura de la dormición de la yema, la germinación de la semilla, entre otros.

Estas moléculas están presentes como moléculas libres en plantas, entre estas la zeatina es la citoquinina libre natural más abundante, así como la dihidrozeatina y la isopenteniladenina en plantas superiores. Estas citoquininas libres se cree son derivadas del RNAt (Taíz y Zeiger, 2009).

Algunos hongos están íntimamente asociados con las plantas superiores produciendo y secretando cantidades importantes de citoquininas provocando que las células vegetales sinteticen estas hormonas vegetales (Akiyoshi et al., citados por Taíz y Zeiger, 2009). Las citoquininas producidas por los microorganismos son la trans-zeatina, cis-zeatina y sus ribósidos. Si bien en muchas ocasiones estas asociaciones con hongos son benéficas, hay casos en que estos organismos pueden inducir a los tejidos vegetales a dividirse y desarrollarse anormalmente con efectos indeseables para la planta.

Los efectos de una sobre producción de citoquininas o una sobre acumulación local de las mismas por la acción de microorganismos en la raíz solo aplican a defectos en este órgano. Según ensayos realizados por Faiss et al., citados por Taíz y Zeiger (2009) sobre injertos, no se observaron consecuencias fenotípicas en el tallo cuando se produjo un aumento de la concentración de citoquininas en raíces.

El concepto vertido en el párrafo anterior es importante ya que en el ensayo de esta tesis los plantines de *E. dunnii* inoculados con *T. harzianum* que presentaron agallas en la raíz exhibieron buenas tasas de desarrollo y conformación general en su parte aérea. De todas maneras se estima que estos plantines debido a su mala conformación radicular no sobrevivirán a campo. Esto es así debido a que el anclaje al suelo y la absorción de nutrientes se ven comprometidos con una masa radicular deficiente en el desarrollo de raíz primaria y raíces secundarias.

Como se indicó anteriormente las citoquininas son necesarias para inducir y regular la división celular de las células vegetales. Esta regulación e inducción se da a partir de la expresión de factores de transcripción y de genes que son importantes en el ciclo de división celular y que están regulados tanto por citoquininas como por auxinas.

Las enzimas que regulan el ciclo celular son las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Éstas responden a la acción de factores de crecimiento, nutrientes y hormonas. La expresión del gen que codifica la principal CDK importante en la transición de la etapa G1 a la S en el ciclo de división celular esta regulada por auxinas. Una alta concentración de citoquininas que provoca un desbalance en detrimento de las auxinas incita a que se inhiba el pasaje normal de la fase G1 a la S inhibiendo por tanto la iniciación de la replicación del ADN característico de esta fase.

Es importante aclarar que es generalmente en la etapa G1 donde las células perciben las condiciones medio ambientales en que se encuentran. Un desbalance hormonal tanto endógeno como exógeno en la rizósfera como el citado anteriormente, será captado en esta fase con las consecuencias descritas.

Sin embargo, las citoquininas también presentan puntos de regulación de este ciclo de división celular. Estas fitohormonas se unen a receptores específicos CRE1 de la membrana plasmática para iniciar una respuesta que culmina con un aumento de la

transcripción de genes ARR tipo A que a su vez podrían regular otros genes y proteínas que podrían alterar las funciones celulares (Taíz y Zeiger, 2009). Específicamente según Soni et al., Riou et al., citados por Taíz y Zeiger (2009) las citoquininas estimulan y aumentan la expresión del gen CYCD3 que codifica una ciclina tipo D importante en la inducción y regulación de este ciclo.

Por tanto, la exposición de los tejidos radicales a niveles altos de citoquininas tanto endógenos como exógenos incrementan el ritmo de la división celular y al mismo tiempo los bajos niveles relativos de auxinas frenan etapas importantes de este ciclo de división. Este desbalance local hormonal a favor de las citoquininas altera la división celular y su expresión génica, o sea hay altas tasas de división celular pero en condiciones anormales, lo que genera la producción de una masa desorganizada de tejido tumoral o agalla en la raíz.

Al respecto y corroborando lo anterior, trabajos realizados por Cortezzi et al. (2001) al evaluar los efectos que diferentes concentraciones de citoquininas tuvieron sobre la multiplicación y brotación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* hallaron que altos niveles de esta hormona, en especial niveles altos de thidiazuron, son la causa del aumento del fenómeno de callosidad en la base de las plantas de *E. dunnii*. Este efecto degenerativo debido a altos niveles de citoquininas también fue reportado por Molinar et al., citados por Cortezzi et al. (2001).

2.7.1.2. Citoquininas y su relación con el genotipo

Por otro lado los tumores también se han relacionado a una sobreproducción de citoquininas debido a genotipos vegetales susceptibles. Se ha observado que híbridos de *Nicotiana tabacum* que producen tumores presentan niveles anormalmente altos de citoquininas en sus tejidos, de 5 a 6 veces mayor que los niveles presentados por sus padres. Se cree que estos tumores se desarrollan a causa de la inactivación de vías de

señalización debido a ciertas combinaciones particulares de genes durante los cruces (Taíz y Zeiger, 2009).

Estudios realizados por Lee et al., citados por Taíz y Zeiger (2009) han demostrado que la supresión de quinasas como la CHRK1 en tabaco por elevados niveles de citoquininas, resulta en plantas mutantes con características semejantes a las exhibidas por los híbridos de tabaco que desarrollaron tumores.

Esto podría señalar que hay plantas que debido a su genotipo son incapaces de regular los niveles hormonales de citoquininas endógenas o exógenas, desarrollando tejidos tumorales por esta causa.

Al respecto, la formación de tumores o agallas relacionadas a ciertos genotipos puede ser una posible explicación al fenómeno observado en plantines de *E. dunnii* en la fase de experimentación de esta tesis, en los cuales se desarrollaron agallas en un 2 a 3 % de ellos en la base de la raíz principal.

Se debe tener en cuenta que las semillas de esta especie proporcionadas a la empresa viverista provienen de programas de mejoramiento genético donde el éxito de los mismos depende de la mayor diversidad genética presente en la especie vegetal con la que se trabaja. En dichos programas de mejoramiento se originan cruzamientos que producen grandes cantidades de combinaciones génicas.

En este sentido estudios genéticos realizados en plantines obtenidos del vivero en el marco evaluativo de esta tesis demostraron la alta variabilidad genética presente en el material bajo estudio.

Por tanto en este material vegetal obtenido en mejoramientos genéticos de *E. dunnii* pueden presentarse genotipos susceptibles a una sobreproducción de citoquininas.

De todas maneras se hará referencia a este tema más adelante en el capítulo Resultados y Discusión.

2.7.1.3. Citoquininas y regulación del crecimiento radicular

Si bien se necesitan citoquininas endógenas para el desarrollo normal de las células meristemáticas y por tanto para el crecimiento normal de tallos y raíces, la aplicación de citoquininas exógenas inhibe la elongación del hipocótilo.

En experimentos realizados en mutantes con sobreproducción de citoquininas existía una inhibición de la elongación del entrenudo y la raíz (Taíz y Zeiger, 2009). Según Cary et al., Vogel et al., citados por Taíz y Zeiger (2009) la inhibición de este órgano por exceso de citoquininas se deba a la producción de etileno.

De todas maneras las concentraciones endógenas de citoquininas a niveles fisiológicos normales ya inhiben los crecimientos radiculares laterales. Es el nivel elevado de auxinas en relación a las citoquininas en condiciones normales lo que promueve la formación y desarrollo de raíces laterales y adventicias.

Las auxinas promueven en el periciclo la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y por tanto a la formación de raíces laterales. A su vez estas señales dependen del balance fisiológico óptimo entre citoquininas y auxinas. Se infiere entonces que niveles locales altos de citoquininas en desmedro del balance de auxinas en las raíces influyen negativamente en la formación de raíces laterales y primarias.

Con respecto a esta afirmación, ensayos llevados a cabo por Chamorro et al. (2007) evaluaron diferentes concentraciones de citoquininas y auxinas en el enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. Misty blue y concluyeron que, aumentos en la

concentración de citoquininas disminuyeron las tasas de multiplicación y formación de raíces.

También Cáceres et al. (s.f.) llegaron a la misma conclusión cuando evaluaron los efectos del agregado de altas concentraciones de citoquininas durante la etapa del enraizado de estaquillas de *Fuchsia magellanica* Lam. (planta de uso ornamental).

2.8. BIOFERTILIZACIÓN POR *Trichoderma harzianum*

La colonización de las raíces por *Trichoderma*, además de aumentar el crecimiento y desarrollo del vegetal, puede aumentar la productividad del cultivo, darle resistencia al estrés abiótico y una eficiente toma y uso de nutrientes por la planta (Benítez et al., citados por Barrios, 2006).

Esto también lo confirman Howell y Godes, citados por Cubillos et al. (2009) que indican que la inoculación de *T. harzianum* aporta beneficios a las plantas, ya que a través de la descomposición de materia orgánica libera nutrientes en formas disponibles para el vegetal.

Esto se debe a que la liberación de ácidos orgánicos por *Trichoderma* en el suelo, provenientes del metabolismo de la glucosa principalmente, favorece la solubilización de fosfatos, minerales, micronutrientes y cationes como el hierro, manganeso y magnesio (Harman et al., citados por Benítez et al., 2004). Corroborado también por (Valencia, Valero, Vera, citados por Cubillos et al., 2009), por lo cual se utiliza a este agente frecuentemente como un organismo biofertilizante en diferentes productos comerciales.

2.9. FACTORES QUE AFECTAN EL DESARROLLO

DE *Trichoderma spp.*

Una vez tenidos en cuenta los posibles factores que afectan la calidad del plantín, es importante señalar cuales son los factores que afectan el desarrollo y actividad de *Trichoderma*, y cuales son las mejores condiciones para que este agente pueda desarrollar su actividad biocontroladora de fitopatógenos, así como biopromotora del crecimiento, en interacción con el medio y el plantín, y a favor de los parámetros de calidad de este último.

Esto es así porque los hongos no interactúan solamente con otros microorganismos y con las plantas, sino que también lo hacen con los componentes del suelo. Las características de este medio pueden afectar o mejorar su capacidad como agentes de biocontrol. Manejar estos factores a favor de *Trichoderma*, teniendo siempre en cuenta el sistema integral patógeno-planta-medio, redundará en definitiva en beneficio de la calidad del plantín.

2.9.1. Efecto nutricional

Si bien una de las características de *Trichoderma* es su alta capacidad de supervivencia en medios desfavorables, hay que tener en cuenta el nivel de elementos nutritivos en el sustrato ya que estos influirán en la población y la eficiencia del agente de biocontrol, debido a que compite por los mismos no solo con los patógenos sino también con la planta. Por esta causa, también es determinante ajustar los parámetros que maneje el vivero en cuanto a niveles nutricionales para evitar deficiencias en los plantines.

En el marco de este trabajo este último concepto es importante. Estudios realizados por Cárdenas (2003) comprobaron que, en la fase de arranque del programa

de fertilización, en sustratos que poseen niveles de nutrientes por debajo del ideal requerido para este tipo de interacciones, *Trichoderma* compite por los mismos con la planta.

Hay entonces una inmovilización temporal de nutrientes en el medio por el agente biológico, produciéndose por consiguiente un efecto negativo en los parámetros morfológicos observados. Este es un concepto a tener en cuenta a la hora de incluir agentes biológicos en la rizósfera.

En el mismo ensayo se indicó que esta situación se revierte si en etapas posteriores del ciclo vegetal se aumentan los niveles de fertilización, generándose entonces una liberación de los nutrientes al medio por *Trichoderma*, favoreciendo así el desarrollo de la planta.

Por lo tanto se puede inferir que ya desde el inicio del ciclo del plantín, es determinante para promover el desarrollo de *Trichoderma* y bajar los niveles de competencia en el sistema mencionado, elevar el nivel de nutrientes en el sustrato. De esta manera se optimiza la disponibilidad de nutrientes en el sistema microorganismo-vegetal, y se aprovecha ya en etapas iniciales, todo el potencial del agente como biocontrolador y promotor del crecimiento.

El género *Trichoderma* no es exigente en nutrientes como indica Michel et al. (2008) en ensayos de supervivencia de este agente en diversos sustratos orgánicos que poseían bajos contenidos en proteínas, grasas y minerales. Si bien los sustratos orgánicos liberan sustancias que pueden ser nocivas para las esporas como quitinasas y glucanasas, *Trichoderma* no tuvo problemas de viabilidad de esporas producidas, según revela el mismo autor.

Este género además, tiene la capacidad de degradar almidón, pectinas y celulosas presentes en la rizósfera, como fuente de carbono; así como fuentes de nitrógeno como nitritos, aminoácidos y amoníaco, entre otros, lo que aumenta su capacidad de supervivencia. Se ha demostrado que el agregado de sulfato de amonio al sustrato estimula el crecimiento de *Trichoderma* (Astudillo y Blanco, citados por Cruz, 2007).

Trabajos realizados por Astudillo y Blanco, citados por Cruz (2007) manifiestan que las concentraciones de carbono en sustrato inferiores a 50g/l, estimulan la producción de conidios, por el contrario concentraciones menores tienden a disminuir la esporulación.

Por otra parte el mismo autor indica que las sales minerales en una concentración elevada de 20 a 70 g/l inhiben la esporulación ya que los iones de sodio y potasio producen una reducción de la presión osmótica de las células.

Si bien los requerimientos en microminerales, sales y vitaminas para el crecimiento de hongos son bajos, hay que considerar que en la mayoría de los hongos filamentosos la absorción de hierro es fundamental, por lo tanto *Trichoderma* tiene la capacidad de liberar sideróforos para captar este elemento en la rizósfera. En cuanto a las vitaminas demandadas las principales son las del complejo B, como tiamina, biotina, piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina, etc.

En cuanto a la relación entre las dosis de fósforo en sustrato en viveros forestales de *E. dunni*, hay investigaciones realizadas por Borges et al. (2004) en Brasil muy interesantes sobre el efecto que diversas dosis tienen sobre hongos biocontroladores y en la biomasa producida por los plantines de esta especie.

En estos trabajos hallaron que dosis de 0,50 a 1,00 mg de P por planta son las más adecuadas en cuanto a compatibilizar el desarrollo del agente en la rizósfera con un buen crecimiento de los plantines de *E. dunnii*.

Si bien tenores de fósforo entre 2.00 y 4.00 mg por planta permitieron todavía visualizar efectos benéficos de los hongos sobre las plantas, dosis de P por encima de los 4.00 mg por planta en el sustrato inhibieron el desarrollo de los hongos.

De todas maneras según Campbell, citado por Cárdenas (2004), es importante al inocular *Trichoderma* en el sustrato, agregar nutrientes para mejorar la base nutricional del medio y de esta manera permitir el incremento en los niveles de inóculo efectivo del agente, lo que redundará en mejorar su capacidad antagonista.

Este concepto es determinante en sustratos de origen inorgánico tales como turba rubia, mantillo de bosque, etc., que poseen un bajo nivel de nutrientes asimilables. Este efecto “starter” al inicio de la inoculación favorece la colonización del sustrato por el agente y el aumento de su población, por tanto los procesos benéficos de *Trichoderma* se darán antes y serán más eficaces.

Por lo visto en este ítem, se destaca que hay requerimientos de nutrientes en menor o mayor medida por el agente, dependiendo del tipo de sustrato utilizado, que favorecerán o perjudicarán su colonización. Esto sin embargo lleva a tener en cuenta la necesidad de nutrientes que también tiene la planta y por lo tanto a ajustar los niveles de fertilización en el sistema de interacción agente biocontrolador-sustrato-vegetal.

2.9.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor importante en la cantidad, tasa de crecimiento y eficacia de un hongo biocontrolador. Numerosos estudios han evaluado el efecto de la temperatura en la germinación de esporas y el crecimiento del tubo germinal; crecimiento del micelio; habilidad competitiva y producción de metabolitos en especies de *Trichoderma*, estableciendo que la temperatura óptima de crecimiento difiere entre especies de este género (Kredics et al., citados por Chávez, 2006).

De acuerdo a trabajos realizados por Besoain (2005), las medias de crecimiento en *T. harzianum* son óptimas entre 25 y 30°C, pero disminuyen en forma significativa con temperaturas inferiores a los 15°C. Sin embargo Sutton y Peng, citados por Galaz (2001), halló que la eficiencia de *Trichoderma* como antagonista de *B. cinerea* era más efectiva entre los 20 – 25°C (68). Por su parte Chávez (2006), estandarizó una temperatura de 25 °C como la ideal para el desarrollo de este género.

2.9.3. Efecto del pH

Tanto el pH del suelo como el del sustrato en caso de viveros, es uno de los principales factores que afecta a *Trichoderma* spp.. La acidez del suelo es un factor que afecta la presencia, densidad y longevidad de este agente (Widden y Abitbol, citados por Michel et al., 2001).

Los valores de pH muy bajos influyen en la germinación de esporas y clamidosporas, y en la formación y producción de metabolitos secundarios por parte del organismo. Por otro lado a pH altos, ciertos productos antibióticos producidos por *Trichoderma* son degradados, afectando por consiguiente la efectividad en la rizósfera del agente biocontrolador.

De todas maneras *Trichoderma* spp. es más eficiente en suelos ácidos que en alcalinos, debido a que su población se ve favorecida en estas condiciones para la formación de conidióforos, la germinación de conidios y porque baja la competencia con otros microorganismos como actinomicetes y bacterias que se encuentran limitados por la acidez (Villegas, s.f.). Al respecto Besoain (2005) comprobó que colonias de *T. harzianum* afectan su crecimiento en más del 50 % a valores de pH por encima de 7.5 a 8.0, siendo el óptimo a valores de pH entre 4.5 y 6.0. Estos valores también concuerdan con los presentados por Domínguez, citado por Galaz (2001).

El pH es un factor importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. Las cepas de *Trichoderma* pueden modificar el pH externo y adaptar su propio metabolismo a las condiciones del entorno para garantizar la viabilidad de sus enzimas secretadas.

Se cree además, que los hongos poseen un sistema de detección del pH exterior que estimula un activador transcripcional de genes de respuesta a medios alcalinos (Benítez et al., 2004). El cual mediante la secreción de ácidos orgánicos como el glucónico y el cítrico logran la acidificación del medio (Gómez, citado por Benítez et al., 2004).

2.9.4. Efecto de la humedad

Si bien en el género *Trichoderma*, sus especies tienen requerimientos de humedad diversas, *T. harzianum* esta adaptada a condiciones de alta de humedad. Como indica Michel et al. (2008) en estudios de supervivencia de *Trichoderma*, este agente presenta una buena producción en aquellos sustratos orgánicos que poseen alto porcentaje de humedad.

Valores cercanos al 87-90% de humedad son bien tolerados, pero no así valores del 100% como indica Elad et al., citados por Galaz (2001). Esta capacidad de *Trichoderma* de adaptarse a altos valores de humedad es una característica significativa para los niveles presentes en sustratos de viveros forestales (Danielson, citado por Negrone et al., 2008).

2.9.5. Efecto del tipo de sustrato utilizado

La capacidad de *Trichoderma* de controlar fitopatógenos en forma efectiva depende del tipo de sustrato utilizado. Más específicamente la capacidad de inducir resistencia es la que se ve afectada según las mezclas utilizadas al confeccionar y preparar el sustrato para contenedores en el vivero.

Relacionado a este tema, estudios realizados en macetas que contenían solo mezclas de turba, demostraron que estas no mejoraban la capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas. Pero sí se comprobó que la modificación de estas mezclas de turba con agregado de corteza compostada mejoraba esta capacidad (Khan et al., citados por Hoitink et al., 2005).

Otro estudio similar, indicó que la supresión de *Phytophthora* por medio de *Trichoderma* en pepino, es más consistente en mezclas de turba modificada con abono, que la realizada en el control que solo contenía mezclas de turba (Khan et al., citados por Hoitink et al., 2005). Según lo indicado por este estudio, estas modificaciones con agregado de compost, aumentan las colonias de *Trichoderma* en 2 a 4 veces más que las colonias desarrolladas en las mencionadas mezclas que contienen solo turba, debido al aumento en la disponibilidad de nutrientes.

Aunque se debe tener en cuenta al usar materiales compostados, que estos procesos se realicen adecuadamente. De otra manera se producirán sustancias originarias

del propio material o por el compostaje en sí, como terpenos, compuestos fenólicos y resinas; y altas relaciones carbono nitrógeno que llevan a la inmovilización de este último por los microorganismos. Estas características de sustratos mal trabajados afectan el desarrollo y supervivencia de microorganismos rizosféricos (Cárdenas, 2003).

2.10. TRICHOSOIL ®

En base a datos recavados de la página web del departamento técnico del laboratorio Lage y cía. S.A., Trichosoil es un producto comercial que actúa como fungicida biológico realizado en base a *Trichoderma harzianum*. Posee un amplio espectro de actividad antifúngica contra un rango importante de patógenos de plantas, actuando principalmente como preventivo.

Este producto ha sido especialmente desarrollado para el control de hongos de suelo, presentando buena eficacia frente a *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia* y *Botrytis cinerea*. También se destaca el control biológico de este compuesto sobre esclerotos y otras estructuras de resistencia de los patógenos a los que *Trichoderma* invade y destruye. Esta acción no la cumplen los productos químicos.

Por otra parte es importante resaltar que Trichosoil tiene un espectro definido de tolerancia a ciertos fungicidas químicos. Esto tiene como consecuencia que, en situaciones de riesgo por elevada presión de la enfermedad sobre el vegetal, puede ser aplicado en combinación con productos químicos para lograr un control más efectivo del patógeno.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR, ÉPOCA Y DURACIÓN DEL ENSAYO

El ensayo se realizó en el vivero “La Buena Unión” perteneciente a la empresa Terrasys S.R.L. cita en el departamento de Rivera, en el período enero – abril 2010.

3.2. INVERNÁCULO

El ensayo se realizó en un invernáculo que posee una superficie de 600 m² aproximadamente. La estructura del mismo esta compuesta por caños galvanizados en los cuales se asientan películas de polietileno transparente con filtro para rayos ultravioletas, además de mallas “sombrite” que protegen tanto de la radiación solar como de la entrada de pájaros. De estas últimas hay de dos tipos, una localizada lateralmente en la estructura que intercepta un 80% de luz solar, y el otro tipo de malla esta ubicada en la parte superior interceptando el 20%.

Figura 1: Imagen de las instalaciones del invernáculo.



Los caminos internos del invernáculo son de hormigón, y delimitan zonas en las que hay estructuras de madera y rieles de chapa que son el sostén y guía de las bandejas. Debajo de estos soportes se le agregó al suelo una cobertura de piedras pequeñas para dificultar el crecimiento de malezas.

3.3. SUSTRATO

El sustrato utilizado en este trabajo se compone de una mezcla de 50% de corteza compostada y 50% de turba. Las propiedades de esta mezcla son las siguientes:

Características químicas

- pH : 3.9 - 4.5
- Conductividad eléctrica: 0.09 - 0.18 mmhos/cm
- C/N Ratio: 100 - 135
- Capacidad de intercambio catiónico: 150 - 250 meq/100 g
- Materia orgánica: 90 - 96 %
- Contenido de cenizas: 4 - 10 %

Características físicas:

- Porosidad total: 96 - 97 %
- Densidad seca: 0.06 - 0.07 g/cm³
- Densidad fresca: 0.11 - 0.14 g/cm³
- Capacidad de retención de agua: 1100 - 1400 % en peso
- Contenido de humedad: 35 - 50 % (base fresca)

3.4. TRICHOSOIL®

Este producto comercial se incorporó al sustrato el 20 de diciembre de 2009, en la dosis recomendada de 2kg/m³. Después de realizada esta operación se cubrió el material por una semana para promover condiciones favorables al desarrollo del agente, posteriormente se removió la mezcla y se cubrió nuevamente por una semana. Finalizado este período el sustrato inoculado está listo para la siembra.

3.5. BANDEJAS

Las bandejas utilizadas por el vivero son de pvc negro y cada una contiene 72 celdas de 96 cm³ de volumen por celda. A su vez estas bandejas tienen un diseño de distribución de celdas que permite la ocurrencia de espacios huecos entre ellas, de manera que mejore considerablemente la repartición de los plantines en la bandeja. Esto favorece el vigor de los plantines y su crecimiento al promover la aireación.

3.6. SEMILLAS

Las semillas de *Eucalyptus dunnii* utilizadas por el vivero y en el ensayo fueron proporcionadas por FOSA (Forestal Oriental S.A.). Estas semillas fueron tratadas con hipoclorito de sodio previo a la siembra con el objetivo de desinfectarlas, aunque también se realiza este proceso para “ablandar” la semilla y de esta manera facilitar la germinación de la misma ¹.

3.7. SIEMBRA

La siembra se realizó el 4 de enero de 2010 utilizando una sembradora automática la cual inserta un promedio de 1.3 semillas por celda. Una vez finalizada la siembra¹ las bandejas se cubren con una capa de vermiculita.

¹ Rosas, M. C. 2010. Com. personal.

3.8. RIEGO

En el riego se utiliza un sistema de aspersión que asegura alta uniformidad y cobertura, además de permitir atenuar pérdidas de semillas y sustrato por lavado. La aplicación de riego utilizado por el vivero depende del estado de desarrollo de los plantines, pero el criterio utilizado generalmente es que el sustrato permanezca siempre húmedo.

3.9. FERTILIZACIÓN

El agregado de nutrientes al sistema sustrato-vegetal se realiza junto con el riego y se ejecuta en tres fases descritas por el vivero en el siguiente cuadro.

Cuadro 1: Tabla correspondiente al programa de fertilización del vivero

Fase	Fecha de inicio y duración aprox.	Fertilizante	Proporción de macronutrientes N-P-K
1	-15 días post-siembra - duración: 20 días	18-44-44-0 (N-P-K); + micronutrientes	1 : 2 : 0
2	- 35 días post-siembra - duración: variable	triple 18 + nitrodoble; + micronutrientes	2 : 1 : 1
3	- 60 días post-siembra - duración: variable	0-52-34 (KPO2) alternado con triple 18; + micronutrientes	0 : 2 : 1 1 : 2 : 1

3.10. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este ensayo se hizo un muestreo independiente en el cual se tomo 10 bandejas por tratamiento en donde cada bandeja es la unidad muestral, totalizando un total de 20 bandejas. Las medidas que se realizaron *in situ* a los plantines en estas unidades muestrales son las siguientes: diámetro de cuello, altura y tasa de supervivencia. En laboratorio: peso fresco y peso seco de parte aérea y raíz, análisis foliar, supervivencia de *Trichoderma* en sustrato y análisis de isoenzimas peroxidasa.

Como el objetivo del ensayo es evaluar la eficacia de *Trichoderma harzianum* en la mejora de los parámetros de calidad de plantines de *E. dunnii*, se plantearon dos tratamientos. Uno de ellos consta de sustrato inoculado con el agente, mientras que el tratamiento que resta no fue inoculado actuando por tanto como testigo.

La inoculación o no del sustrato con el agente es la única variable entre los dos tratamientos. Las restantes variables utilizadas por el vivero en el desarrollo de los plantines son completamente iguales para los dos tratamientos especificados.

Cuadro 2: Tipo de tratamientos empleados en el ensayo.

T0	sustrato sin inocular
T1	sustrato con inóculo

Posteriormente a la obtención de los datos se analizaron las variables para inferir los parámetros poblacionales diámetro y desvío estándar, considerando a éste último como intervalo de confianza. A través de la elaboración y estudio de estos parámetros se inferirá en el capítulo Resultados y Discusión las conclusiones pertinentes.

3.11. MUESTREO

3.11.1. En sustrato

Para este componente se realizó un análisis de supervivencia de *Trichoderma harzianum* en muestras tomadas el 13 de abril. Este análisis se efectuó en el laboratorio de la empresa Lage y cía. S.A.

3.12.2. En plantines

3.12.2.1. Parámetros morfológicos

Los parámetros morfológicos altura y diámetro de cuello se realizaron en dos oportunidades: 16 de febrero y 13 de abril en bandejas seleccionadas por sorteo para tal efecto.

3.12.2.2. Parámetros fisiológicos

La toma de muestras para realizar el análisis foliar se efectuó en las siguientes fechas: 13 de abril y 27 de abril de 2010. Para la evaluación de las variables fisiológicas peso fresco y peso seco de los plantines las muestras se tomaron el 13 de abril de 2010. La toma de medidas de las variables mencionadas se realizó en laboratorios pertenecientes al Departamento Forestal de la Facultad de Agronomía.

3.13. MEDIDAS REALIZADAS

3.13.1. En sustrato

Se tomaron muestras de los dos tratamientos y se efectuaron los análisis correspondientes a supervivencia del agente en el sustrato en el laboratorio de Lage y cía. S.A.

Dicho procedimientos consta de los siguientes pasos:

- Extracción de 10 g de sustrato de cada muestra y posteriores diluciones (10-3, 10-4, 10-5).

- Siembra de las distintas diluciones en una cantidad de 0,5 ml por placa de Petri, previamente esterilizadas en un medio de cultivo con los siguientes contenidos:

- Glicerol 9cc/l
- Agar 10 g
- Extracto de levadura 1,5 g/l
- Cloruro de sodio 0,1 g/l
- Sulfato de magnesio 0,2 g/l
- Sulfato de estreptomicina 50 mg
- Fosfato dipotásico (al 50%) 1 g/l
- Colorante rosa de bengala 0,15g/l

- Se ajustó a un pH de 5-5,3. Las placas se prepararon 2 días antes de sembrar el inóculo, conteniendo 13 ml del medio cada placa.

- Posteriormente a la siembra del inóculo, las placas se colocaron en estufa a 23 ± 2 °C durante 48 horas cuando se hizo el primer recuento. A las 72 horas se hace el segundo recuento y se espera hasta la esporulación del hongo.

- El doble del recuento promedio de las placas (se multiplica por dos porque se usan 0,5cc por placa) se multiplica por la dilución que le corresponde. Los datos se expresan en UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de sustrato.

3.13.2. En plantines

3.13.2.1. Mediciones morfológicas

Estos parámetros se midieron en aquellos plantines que se encontraban en las bandejas seleccionadas. A éstos plantines se los midió en dos oportunidades: 16 de febrero y 13 de abril. Para la ejecución de estas medidas se utilizó regla milimetrada para la altura y calibre para diámetro de cuello.

3.13.2.2. Mediciones fisiológicas

Los análisis foliares se realizaron en las instalaciones del Laboratorio del Sur S.R.L. a cargo de la Ing. Agr. María Jauregui, analizándose para tal efecto 10 plantines de cada tratamiento para cada período de muestreo.

Para la realización de estas mediciones (peso fresco/seco de parte aérea/raíz) se sortearon plantines al azar por tratamiento. El procedimiento utilizado para la medición de peso fresco del plantín fue enjuagar las muestras para quitar residuos de sustrato, y separar la parte aérea de la radicular. Posteriormente se secaron las mismas en papel absorbente para retirar el exceso de agua, y a continuación se pesaron en una balanza de alta precisión. Para efectuar las medidas de peso seco se secaron las muestras en el microondas variando los tiempos de secado en función del tamaño de las mismas.

3.13.2.3. Análisis de actividad peroxidasa

La evaluación por electroforesis de isoenzimas se realizó en los laboratorios de genética de la Facultad de Agronomía y fue supervisado por el profesor de la cátedra de Genética Lic. Jorge Pereira.

El procedimiento para la preparación de muestras es el siguiente: de las plantas a analizar se extrajeron con una tijera entomológica 150 miligramos de hojas de plantines tratados con *Trichoderma harzianum* y se extrajo la misma cantidad de aquellos que no

fueron tratados. Con este material se preparó un extracto proteico a partir del macerado de cada muestra en tubos “Eppendorf” de 1,5 ml que contenían 100 μ l de tampón de extracción.

El análisis isoenzimático se efectúa de la siguiente forma: las migraciones electroforéticas de las muestras analizadas se realizaron en placas de acetato de celulosa (94 X 76 mm, Helena Laboratories, Beamount, TX; n° ref. 3024).

La migración se desarrolló a temperatura ambiente en cubas horizontales de plástico (Helena, mod. 1283, 280 X 170 mm). El kit de aplicación (Helena) consiste en un aplicador, una placa de depósito de muestra, y una placa de alineamiento. Ver figura siguiente.

Figura 2: Imagen de kit de aplicación Helena, más placas de acetato.



Previo al depósito de las muestras en la placa de acetato mediante el kit de aplicación, la misma se somete a un paso de imbibición con el tampón de migración. Los parámetros referentes a la dilución del tampón de migración para la imbibición, el

voltaje y el tiempo de migración, se pusieron a punto de manera de obtener los mejores resultados para cada sistema isoenzimático en particular y el material vegetal a estudio.

El tiempo de imbibición de la placa de acetato previo a la electroforesis fue de 20 minutos. El tiempo de migración varió según el ensayo entre 25 y 35 minutos, y el voltaje fue de 200 V. Durante la migración se controló la resistencia del sistema de modo que la misma no excediera los 10 mA para evitar el recalentamiento de la placa.

El posterior revelado de las placas de electroforesis se efectuó inmediatamente finalizada cada migración, sobre matriz de agarosa al 1,2 % (w/v) y con los reactivos necesarios para la coloración específica.

Las soluciones para la coloración se detallan a continuación:

- Solución final 10 ml
- 9ml acetato de sodio 0,2 M pH 5,0
- 200 µl CaCl_2 0,1 M
- 5 µl H_2O_2 (30 %)
- Amino etil carabazol punta de espátula (~ 15 mg)
- 1 ml dimetilformamida (DMF)

Tras la aparición de bandas se detiene la reacción, sin embargo el tiempo depende de cada sistema isoenzimático variando entre 10 y 30 minutos. Se fija la coloración, colocando la placa en una solución de ác. acético 5 % (10 minutos). Posteriormente se enjuaga la placa con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente. Las placas pueden ser almacenadas indefinidamente a temperatura ambiente sin ninguna precaución especial

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se describió en la revisión bibliográfica, numerosos trabajos demuestran que la relación *Trichoderma harzianum* – vegetal posee numerosos beneficios que contribuyen a inducir cambios tanto en la fisiología de las plantas como en su morfología y función.

En este sentido los beneficios que los plantines de *Eucalyptus dunnii* en el vivero pueden recibir por el agregado de *Trichoderma* están relacionados con lograr un destacado desarrollo vegetativo de la planta en un período de tiempo sensiblemente menor, con todos los beneficios económicos que ello acarrea al vivero así como a un aumento de los niveles de control de enfermedades por el vegetal.

Estos beneficios en la interacción del bioagente con el vegetal serán perceptibles en los ítems posteriores en los cuales se analizará el desempeño de *Trichoderma harzianum* incorporado en sustrato. A través de la consideración de diversas variables estudiadas y analizadas en el marco de este trabajo, se intentará demostrar la influencia positiva en términos fisiológicos y morfológicos de este agente en el vegetal.

4.1. ANÁLISIS FOLIAR

La adecuación y ajuste de los requerimientos nutricionales es decisivo para el desarrollo de los plantines y para la obtención de los mismos dentro de los parámetros de calidad exigidos, ya que las deficiencias tanto de macro como de microutrientes en *Eucalyptus* son comunes en viveros forestales (Romero y Marius, 2002).

La utilización del análisis foliar es una de las técnicas cada vez más empleada para conocer el estado nutritivo de las plantaciones de *Eucalyptus* y asesorar sobre las

fertilizaciones mas adecuadas, ya que los factores fisiológicos como resistencia a heladas, capacidad de crecimiento radicular y resistencia a sequía importantes en la etapa de plantación, están afectados por el nivel nutricional de la planta (García, 2007).

En este trabajo el análisis foliar se realizó en dos períodos de muestreo a fin de estudiar la evolución fisiológica de los plantines en el tiempo en relación a su nivel nutricional y comportamiento del agente en esta variable. Como primera aproximación se puede observar en el cuadro 3 que los niveles de macro y micro nutrientes analizados en este trabajo se encuentran por encima de los niveles nutricionales promedio mencionados en la literatura para la especie *Eucalyptus dunnii*.

Cuadro 3: Concentraciones foliares de macro y micronutrientes correspondientes a períodos y tratamientos diferentes

período	tratamiento	macronutrientes					micronutrientes				
		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B
		% de la materia seca					ppm				
I	s/Tricho.	2.28	0.34	1.54	0.93	0.4	102	350	25	140	46
I	c/Tricho.	2.54	0.31	0.93	1.01	0.34	107	330	19	270	42
II	s/Tricho.	2.77	0.34	1.31	0.74	0.35	103	265	24	860	24
II	c/Tricho.	2.93	0.37	1.19	0.83	0.39	132	320	26	900	45
Concentración promedio de nutrientes foliares presentes en <i>Eucalyptus dunnii</i>											
		1.93	0.09	0.74	0.44	0.16	153	137	9	11	----

Los niveles de nutrientes foliares se encuentran por encima de los niveles promedio debido claramente al cuidado que el vivero deposita en su programa de fertilización, sin embargo es importante señalar los niveles alcanzados, en los tratamientos con el bioagente, por nutrientes que son claves en la fisiología y desarrollo del plantín, y que son determinantes en señalar a *Trichoderma* en el marco de este trabajo, como principal contribuyente del sistema hongo – plantín.

De esta manera y con el análisis específico de estos nutrientes se podrá evaluar el desempeño de *Trichoderma harzianum* separándolo de otros efectos que si bien son positivos enmascaran el efecto específico del agente en la asociación mencionada. Estos nutrientes señalados por la literatura como los principales en evidenciar la sinergia de acción del bioagente con el vegetal son: nitrógeno, hierro y manganeso.

4.1.1. Nitrógeno

Este elemento es clave para la constitución de proteínas, clorofilas, enzimas y ATP entre otros componentes, lo que favorece el desarrollo foliar y fortalece la parte aérea del plantín. Al observar el cuadro 3 se evidencia que los niveles de nitrógeno foliar alcanzados en los dos tratamientos son mayores al indicado en la literatura. En los dos períodos bajo análisis los tratamientos con *Trichoderma* lograron altos niveles de nitrógeno foliar. En el primer período se logró un 11.4 % más de nitrógeno en los plantines tratados y un 5.8 % más en el segundo período para el mismo tratamiento.

El tamaño del plantín se correlaciona positivamente con el contenido de nitrógeno foliar. Por tanto estos niveles alcanzados son importantes en lo que tiene que ver con la fisiología del plantín ya que favorecen el desarrollo foliar y fortalecen la parte aérea como ya se mencionó, lográndose de esta manera una buena arquitectura general del plantín. La clave en este aumento de contenido de nitrógeno en la planta es el mejoramiento y desarrollo del sistema radicular por la acción de *Trichoderma*, concepto que se seguirá mencionando en los ítems posteriores.

Por consiguiente la colonización de las raíces por *Trichoderma* mejora el crecimiento, desarrollo y captación de nutrientes en el vegetal debido a que el agente produce factores de crecimiento hormonales que actúan como catalizadores de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su

reproducción celular. Esto consigue que la planta se desarrolle más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con este agente.

No obstante lo anterior, el bioagente no solamente favorece la mayor absorción de nitrógeno debido a un mayor volumen radical de absorción, sino que el aumento de disponibilidad de nutrientes en el suelo por parte del bioagente facilita la posterior absorción radicular por parte del vegetal.

En cuanto al objetivo comercial de *Trichoderma*, no menos importante es lo que le significó este aumento en los tenores de nitrógeno al vivero en relación a su funcionamiento. Aquellos plantines tratados con *Trichoderma* lograron altos niveles de desarrollo en un período de tiempo menor que los plantines sin tratamiento. Aproximadamente 3 semanas antes de lo estipulado los plantines asociados a *Trichoderma* ya habían comenzado las etapas de clasificación.

Según los técnicos del vivero esta etapa de manejo se sucedía en el tiempo más rápidamente en los plantines tratados ya que se alcanzaban los estándares para pasar a las etapas siguientes en un tiempo menor. Esto permitió que los mismos salieran antes para la etapa de plantación a campo lo que significa claramente un beneficio.

En cuanto al programa de fertilización del vivero, en este trabajo se constató que se debió aplicar menos fertilizaciones con nitrógeno en los plantines bajo tratamiento, o dicho de otra manera se necesitaron 20 días más de fertilización nitrogenada en los plantines sin tratamiento.

4.1.2. Hierro

Cabe aclarar que el hierro es importante como catalizador de reacciones redox de fotosíntesis y respiración, por tanto es un nutriente de gran importancia fisiológica para

el vegetal. En el caso de asociaciones con hongos endofíticos esta sinergia estimula la producción de exudados de raíz como los flavonoides. Estos exudados reaccionan con los microorganismos para la síntesis de estas sustancias que favorecen sinérgicamente la absorción de nutrientes tanto para el vegetal como para el bioagente. Sin embargo lo destacable en este marco es que estos exudados pueden producir la quelatación de iones metales en la rizósfera afectando de esta manera la toma y disponibilidad de nutrientes como el hierro.

En este sentido se ha reportado que *T. harzianum* es capaz de producir sideróforos que quelatan Fe, Fe^{3+} así como Cu^{2+} lo que genera un incremento en la biomasa de los plantines al aumentar su disponibilidad en el suelo (Alternare et al., citados por Donoso et al., 2008).

En el cuadro 3 se puede visualizar que los niveles foliares de hierro han aumentado en los tratamientos con *Trichoderma* en los dos muestreos, un 4.9 % para el primero y un 28.21 % para el segundo. Este mayor valor para el segundo período puede deberse a que la población fúngica del agente en el sustrato aumentó, elevándose consecuentemente la disponibilidad de hierro para el vegetal.

El beneficio de este aumento en los niveles fisiológicos del hierro radica en la valoración de la rusticidad del plantín en la etapa de plantación. Las plantas al ser llevadas a campo no pueden continuar inmediatamente los procesos fotosintéticos debido al estrés de plantación (Cóppola et al., 2000), dependiendo entonces de las reservas de carbohidratos en la etapa de vivero.

Por lo tanto estos altos niveles de hierro aseguran, junto a otros nutrientes, que el vegetal tenga altas tasas fotosintéticas y que en consecuencia se produzcan altos niveles de sacarosa y almidón. Estas reservas serán importantes junto a los niveles de antocianinas porque permitirán contribuir a la regulación osmótica en condiciones de

estrés hídrico y aumentar la tolerancia a descensos en la fotosíntesis comunes en las primeras etapas a campo (Hoch et al, citados por García, 2007).

4.1.3. Manganeso

Este nutriente es requerido para importantes funciones vegetales como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de compuestos aromáticos como fenoles y lignina, por lo tanto el manganeso tiene un rol importante en la resistencia a enfermedades.

Los suelos con pH alto disminuyen la solubilidad y absorción del manganeso, por consiguiente la acidificación del suelo por parte de microorganismos contribuye a aumentar la disponibilidad de este nutriente para la planta. Al respecto *Trichoderma* favorece este proceso reduciendo el magnesio no disponible a Mn^{2+} que es la forma de absorción radicular de este ión, además el bioagente puede servir de reservorio de este catión para hacerse disponible posteriormente.

En el cuadro 3 se pueden visualizar los conceptos anteriores, en donde los niveles de manganeso son mayores en el segundo muestreo alcanzando un 21.6 % en los plantines tratados, mientras que para el primer muestreo se mantiene en valores similares para ambos tratamientos.

Esto es consecuencia de que la acidificación del suelo debida a la liberación de ácidos orgánicos por *Trichoderma* en el suelo, provenientes principalmente del metabolismo de la glucosa, favorece la solubilización de fosfatos, minerales, micronutrientes y cationes como el manganeso, entre otros (Harman et al., citados por Benítez et al., 2004), que serán tomados por el vegetal.

Sin embargo Altomare et al., citados por Araya (2005) señalan que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar el manganeso sin importar el pH del medio ni la disponibilidad del mismo, es decir, que lo solubiliza continuamente. De todas maneras estos estudios también confirman la promoción del crecimiento vegetal por *Trichoderma* en relación a este nutriente.

La mayor capacidad de absorción radicular y esta mayor disponibilidad de nutrientes en conjunto con los demás elementos favorecen el desarrollo, resistencia y sanidad del plantín. Esto se visualiza en las imágenes siguientes en donde se puede apreciar el desarrollo superior del plantín bajo tratamiento.

Figura 3: Imagen izq. plantín sin tratamiento; imagen der. plantín con tratamiento



4.2. VARIABLE DIÁMETRO

La calidad y el potencial de la plantación en el momento de cosecha final esta relacionada directamente con la calidad del plantín en la etapa de vivero. Por lo tanto es significativo controlar y normatizar parámetros de calidad basados en criterios cuantitativos para definir una planta de buena calidad en cada etapa del proceso productivo del vivero forestal.

En este sentido los parámetros morfológicos pueden ser utilizados como un factor de predicción cualitativa del futuro comportamiento de la planta en el campo (Cóppola et al., 2000). En este sentido ensayos a campo realizados por Thompson, citado por García (2007), donde se evaluó la correlación entre parámetros y comportamiento a campo de plantines, han demostrado que el diámetro de cuello es el mejor predictor individual del crecimiento y supervivencia en plantación.

Esto es así porque este parámetro puede reflejar el tamaño del sistema radicular y por tanto ser determinante con valores altos, en la resistencia al doblamiento, tolerancia al daño causado por insectos y animales (INIFAP, citado por Cóppola et al., 2000). Esta afirmación también es compartida por Schmidt, citado por Cóppola et al. (2000) que comprobó una alta correlación entre el diámetro de cuello y la supervivencia y productividad a campo del plantín.

En este sentido, bajo condiciones favorables los plantines de mayor diámetro sobreviven y crecen mejor que aquellos plantines de menor diámetro. El diámetro de cuello es una variable muy importante a la hora de evaluar el comportamiento a campo en cuanto a la resistencia a las heladas. A mayor diámetro, descontando otras variables como las nutricionales, la resistencia a este fenómeno aumenta.

En este experimento se evidenció un efecto positivo de la aplicación de *Trichoderma* en la variable diámetro de cuello de los plantines y en el tiempo de obtención de este parámetro. En el cuadro 4 se observa que en el primer período el tratamiento con el agente es 9.5 % superior mientras que en el segundo período es 31.6 % superior. Si bien el desvío estándar en este muestreo es mayor al primero, los valores de dispersión son similares.

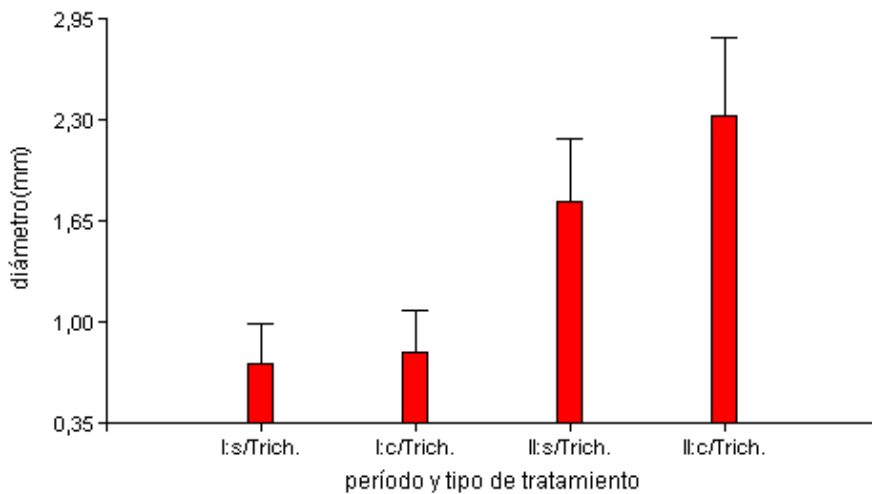
Cuadro 4: Tabla de diámetros promedio y desvío estándar según tratamiento y período.

Período	Tratamiento	Variable	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo
I	s/Tricho.	diám. (mm)	316	0.73	0.26	0.50	1.50
I	c/Tricho.	diám. (mm)	362	0.80	0.27	0.50	2.00
II	s/Tricho.	diám. (mm)	210	1.77	0.40	1.00	3.00
II	c/Tricho.	diám. (mm)	347	2.33	0.50	1.00	4.00

Estos percentiles observados continúan en la línea de los conceptos vertidos anteriormente. En este caso los efectos benéficos del agente en la fisiología del vegetal se hacen visibles en los parámetros morfológicos, parámetros que según trabajos realizados son muy evaluados por los viveristas.

Los niveles nutricionales alcanzados en el desarrollo del plantín por acción de *Trichoderma* estimulan su crecimiento, lo que fácilmente se observa en el gráfico de la figura 4 para el segundo período de muestreo.

Figura 4: Gráfico de diámetros promedio y desvío estándar según tratamiento y período.

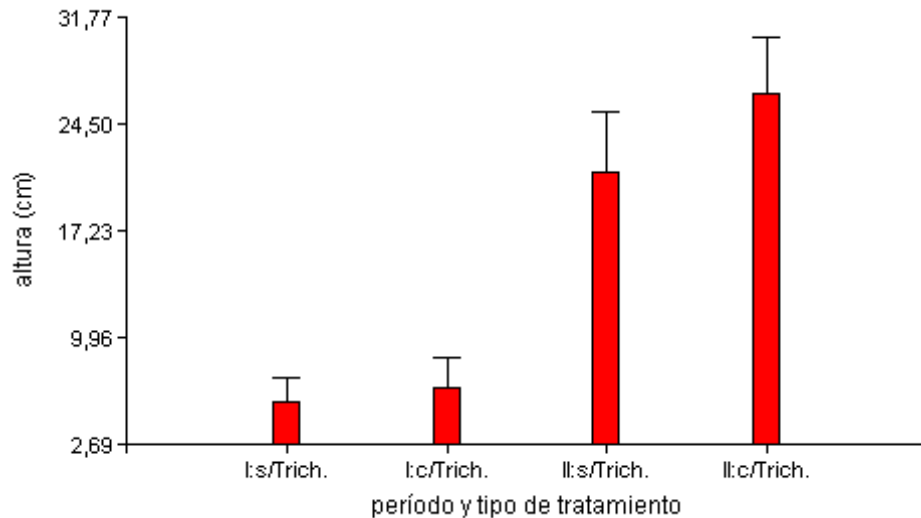


4.3. VARIABLE ALTURA

Siguiendo con la línea de trabajo, el parámetro altura de plantín es el criterio más utilizado de todos los parámetros según encuestas realizadas en viveros forestales. Sin embargo su confiabilidad es cuestionada ya que según los numerosos muestreos realizados fue el parámetro que más variabilidad presentó (García, 2007).

Este último concepto no concuerda con los datos analizados en esta tesis ya que la dispersión de los datos para la altura mostraron un desvío estándar menor en relación al resto de los parámetros analizados, ver gráfico de alturas de la figura 5.

Figura 5: Gráfico de alturas promedio y desvío estándar según tratamiento y período.



De todas maneras la utilidad de la variable altura de plantín se incrementa si se la correlaciona con la medida del diámetro de cuello como evidencian estudios en eficacia de indicadores de calidad de plantines forestales (INIFAP, citado por Cópola et al., 2000).

Al respecto, al considerar la calidad del plantín importa la relación entre estas dos variables, ya que una baja relación altura/diámetro de cuello favorece la arquitectura general del plantín en cuanto a resistencia y por tanto su funcionalidad y supervivencia a campo.

En este sentido trabajos efectuados en la provincia de Entre Ríos en *Eucalyptus grandis*, en relación a la resistencia a heladas de plantines en etapa de campo procedentes de viveros, realizaron agrupaciones en clases determinadas por la relación altura/diámetro encontradas.

En este ensayo se llegó a la conclusión de que las plantas con relaciones menores a 8 resultan más afectadas por las heladas que las que presentaban clases con relaciones altura/diámetro entre 10.2 y 13.3, las que tuvieron un buen comportamiento a campo (García, 2007). Tomando estos datos como referencia, se analizó para esta tesis la relación mencionada tomándose los valores de diámetro y de altura del segundo muestreo. El mismo dio como resultado una relación de 11.3, hallándose por tanto este valor entre los aceptados por la literatura como óptimos.

Cabe aclarar que relaciones mayores a 13.3 no sobreviven de manera óptima. Por tanto buenos valores de diámetro y alturas medias generan una estructura interna óptima en el plantín para resistir el estrés de la etapa de plantación.

Cuando se consideran los muestreos realizados, se puede observar en el cuadro 5 que los valores de altura para los plantines bajo tratamiento para el período I es de 11.3 % superior mientras que para el período II es de 13.3 %. Esto concuerda con los ítems anteriores en donde el buen nivel nutricional y más específicamente los altos valores de nitrógeno alcanzados por el plantín asociado a *Trichoderma* estimulan el desarrollo aéreo vegetativo.

Cuadro 5: Tabla de alturas promedio y desvío estándar según tratamiento y período.

Período	Tratamiento	Variable	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo
I	s/ <i>Tricho.</i>	altura. (cm)	316	5.59	1.58	1.00	10.00
I	c/ <i>Tricho.</i>	altura. (cm)	362	6.48	2.18	1.70	15.00
II	s/ <i>Tricho.</i>	altura. (cm)	210	21.26	4.11	6.00	31.50
II	c/ <i>Tricho.</i>	altura. (cm)	347	26.52	3.94	10.00	39.00

A su vez coincide con numerosos trabajos en los cuales se demuestra que *Trichoderma* es efectivamente un agente promotor del crecimiento vegetal.

Evaluaciones realizadas sobre plantas de ajitomate, por el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma de Chapingo, evidenciaron que *T. harzianum* promueve el crecimiento de estas plantas ya que la altura de las mismas se incrementó significativamente (García y Pérez, 2003).

4.4. VARIABLE PESO FRESCO DE RAÍZ

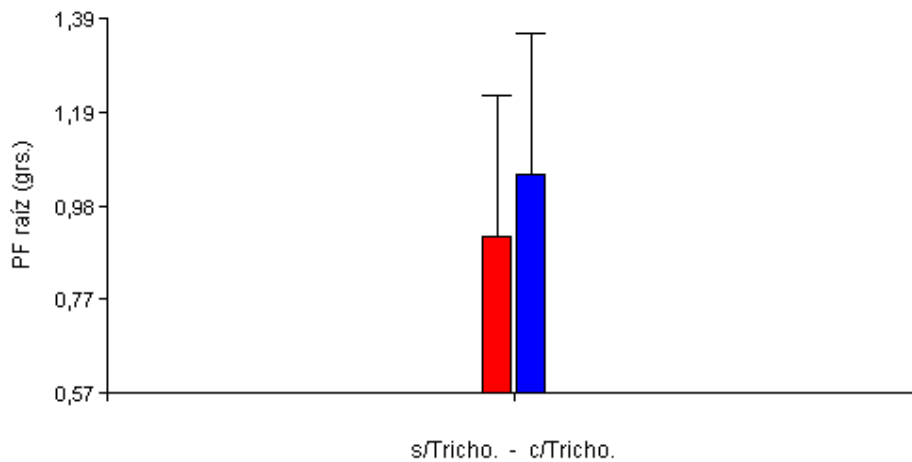
En el análisis de esta variable se observa que la aplicación de *Trichoderma* tuvo efectos positivos ya que en el período analizado se observó un aumento del 15.3% en el peso fresco de raíz en los plantines tratados (Cuadro 6). Por lo tanto se mantiene la tendencia de un mejor comportamiento en el aumento de la biomasa radical expresada por esta variable como consecuencia de la aplicación del bioagente.

Cuadro 6: Tabla de peso fresco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento

Variable	Tratamiento	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo
PF de raíz (gr)	s/Tricho.	50	0.91	0.31	0.20	1.74
PF de raíz (gr)	c/Tricho.	44	1.05	0.31	0.16	1.76

Es importante recordar que *Trichoderma* estimula la expresión de genes que regulan la producción de auxinas y citoquininas, hormonas importantes en la producción de raíces principales y laterales. Por ejemplo plantas de *Arabidopsis* inoculadas con este agente aumentaron su volumen de raíces laterales de 4 a 6 veces según trabajos realizados por Contreras et al. (2009). También concuerda con mediciones realizadas por Negrone et al. (2008) en este mismo tipo de trabajo en pino taeda. Visualizar estos conceptos en la gráfica de la figura 6.

Figura 6: Gráfico de peso fresco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento



4.5. VARIABLE PESO SECO DE RAÍZ

Este parámetro se tiene en cuenta como un índice útil de desarrollo de la raíz y es necesario además para el cálculo de la relación tallo/raíz. En este experimento la variable peso seco de raíz mantiene la misma tendencia que la variable peso fresco de raíz.

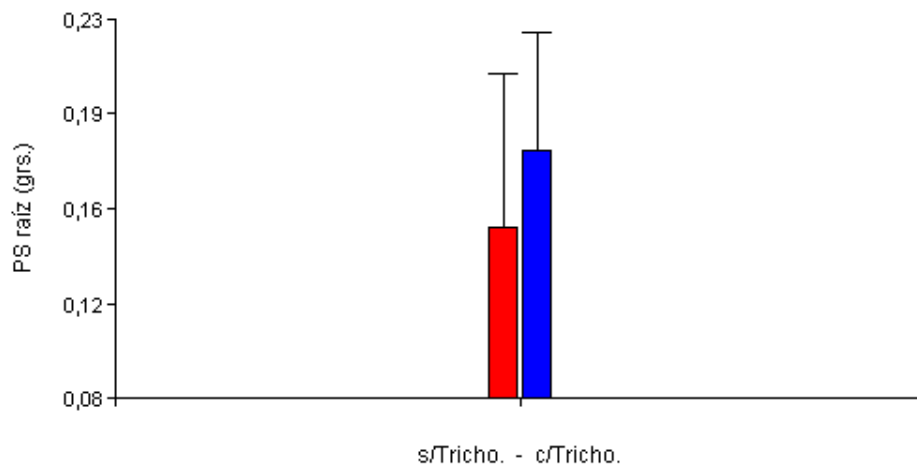
El porcentaje de aumento en plantines tratados en el período es del 20 % (Cuadro 7), este percentil se explica por los conceptos nutricionales vertidos en los ítems anteriores y que tienen como consecuencia el mejoramiento y desarrollo del sistema radicular por la acción de *Trichoderma*.

Esto concuerda con trabajos realizados por Ezziyyani et al. (2005) que hallaron que las semillas de pimiento inoculadas con *T. harzianum* incrementaron el porcentaje de germinación y el peso seco de las plantas.

Cuadro 7: Tabla de peso seco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento

Variable	Tratamiento	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo
PS de raíz (gr)	s/Tricho.	50	0.15	0.06	0.02	0.36
PS de raíz (gr)	c/Tricho.	44	0.18	0.05	0.08	0.28

Figura 7: Gráfico de peso seco de raíz promedio y desvío estándar según tratamiento



4.6. VARIABLE PESO FRESCO DE LA PARTE AÉREA

En cuanto al análisis de la variable peso fresco de la parte aérea, un mayor valor de este parámetro en relación al peso radicular puede significar un mayor desarrollo del plantín en la etapa de plantación (Simposio de Viscosa, citado por Cópola et al., 2000). Sin embargo para que esto se cumpla el peso aéreo no debería doblar el peso de la raíz (Montoya, citado por Cópola et al., 2000).

En este muestreo al observar las tablas correspondientes, esto se cumple aunque en su límite ya que el peso fresco aéreo dobla exactamente al peso fresco de raíz. En

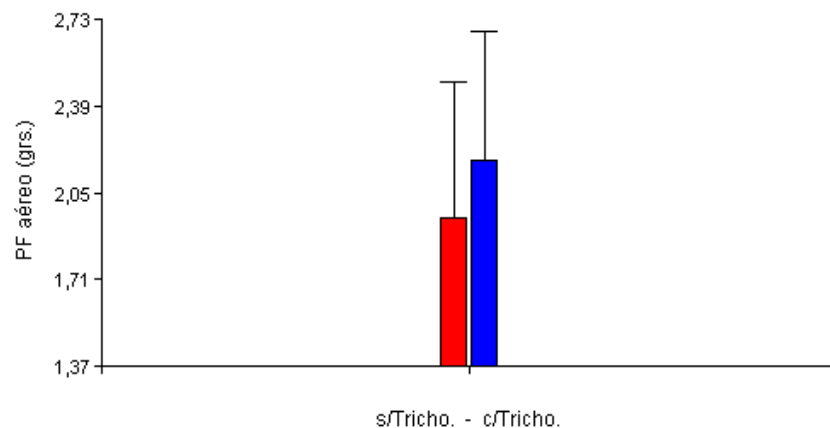
otro aspecto y continuando con la tendencia bajo análisis en el cuadro 8 se observa un aumento del 11.8% para el período en estudio. Por lo tanto se visualiza un aumento del peso de la parte aérea para los plantines a los que se les aplicó *Trichoderma*.

Esto es concordante con lo expresado en el análisis nutricional de capítulos anteriores en donde ensayos realizados por Osiewacz, citado por Benítez et al. (2004) han demostrado que este agente produce factores de crecimiento como auxinas y citoquininas que promueven el crecimiento del plantín, coincidente con evaluaciones de peso fresco de la parte aérea de pinos taeda realizadas por Negrone et al. (2008).

Cuadro 8: Tabla de peso fresco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento

Variable	Tratamiento	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo
PF aéreo (gr)	s/Tricho.	50	1.95	0.53	0.66	3.64
PF aéreo (gr)	c/Tricho.	44	2.18	0.50	1.10	3.12

Figura 8: Gráfico de peso fresco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento



4.7. VARIABLE PESO SECO DE LA PARTE AÉREA

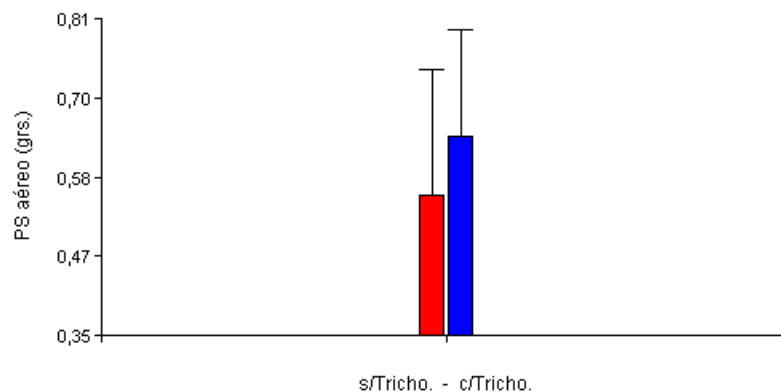
En el muestreo realizado se evidenció que la aplicación de *Trichoderma* produjo un aumento de la media en un 16.3 % (Cuadro 9) para el período bajo estudio, confirmando las tendencias analizadas en los ítems anteriores.

Al respecto, y confirmando lo observado en el muestreo, hormonas del crecimiento como, etileno, ácido acético, auxinas y citoquininas producidas por *Trichoderma* actúan sobre tejidos meristemáticos de la planta, lográndose así un desarrollo más acelerado en comparación con plantas no tratadas con el bioagente (Valencia et al., citados por Cubillos et al., 2009).

Cuadro 9: Tabla de peso seco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento

Variable	Tratamiento	n	Media	D. E.	Mínimo	Máximo
PS aéreo (gr)	s/Tricho.	50	0.55	0.18	0.16	1.08
PS aéreo (gr)	c/Tricho.	44	0.64	0.15	0.32	0.92

Figura 9: Gráfico de peso seco promedio de parte aérea y desvío estándar según tratamiento



4.8. NIVEL DE SUPERVIVENCIA DE PLANTINES

En el marco de esta tesis se realizaron conteos de individuos en cada muestreo para evaluar la supervivencia de los plantines bajo los dos tratamientos. En el cuadro 10 se observa que la variación de supervivencia para los plantines asociados a *Trichoderma* es menor que los plantines sin tratamiento.

Cuadro 10: Tabla de supervivencia de plantines por período y tratamiento

Tratamiento	Población en % Muestreo I	Población en % Muestreo II	Variación de supervivencia en %
C/Trich.	50,27	48,19	- 4,13
S/Trich.	43,32	35,27	- 8,05

Sin perjuicio de lo concluido en el párrafo anterior es notorio al observar el cuadro, el número inicial en porcentaje de la población en el primer muestreo sin importar el tipo de tratamiento. Este dato poblacional asociado a la calidad de la semilla, es bajo si se lo compara con valores poblacionales de otras especies forestales trabajadas en viveros. Esto es así debido al origen de la semilla de *Eucalyptus dunnii* utilizada en el vivero.

Como ya se analizó en la revisión bibliográfica, las semillas de esta especie proporcionadas a la empresa viverista provienen de programas de mejoramiento genético donde el éxito de los mismos depende de la mayor diversidad genética presente en la especie vegetal. En estos programas como es sabido se originan cruzamientos que producen grandes cantidades de combinaciones génicas, lo que aumenta aún más la variabilidad presente en el material y por tanto el aumento de genotipos que pueden fallar a la hora de germinar o en la etapa de desarrollo del plantín.

Si bien estos materiales a evaluar provienen de un área natural de distribución de *E. dunnii* muy pequeña como para pensar que no existiría una gran variabilidad genética, estudios realizados por el Programa Forestal del INIA a cargo de Resquín (2003) confirman lo expresado en el párrafo anterior y lo observado en los muestreos de esta tesis en cuanto a la bajas tasas de germinación observadas. Por otra parte en este estudio realizado por el INIA se halló una gran dispersión de los datos obtenidos en ensayos de supervivencia de diferentes orígenes de *E. dunnii* lo que concuerda con los valores de desvío estándar hallados en esta tesis.

4.9. ANÁLISIS DE SUSTRATO

En esta variable se analiza la supervivencia de inóculos de *Trichoderma harzianum* aplicados al sustrato, de la cual se obtuvieron los siguientes datos:

- Sustrato inoculado con **Trichosoil**, (plantas sanas): $2,2 \times 10^5$ ufc/g
- Sustrato inoculado con **Trichosoil**, (plantas enfermas): $3,4 \times 10^5$ ufc/g
- Sustrato sin inocular: $5,4 \times 10^4$ ufc/g

El sustrato inoculado tiene aproximadamente 10 veces más de *Trichoderma* que el sustrato no inoculado luego de 3 meses de realizada la inoculación, lo cual indica una buena instalación de *Trichoderma*. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Negrone et al. (2008) los cuales hallaron niveles similares de supervivencia de *Trichoderma* en sustrato.

Se analizó también el sustrato de las plantas con problemas radiculares (enfermas) y no se encontraron diferencias significativas con respecto al de las plantas sanas en cuanto a la población fúngica. Recordar que en la revisión bibliográfica se trató sobre este fenómeno ocurrido en el vivero en cuanto a la aparición de agallas en la base de la raíz de un determinado porcentaje de plantas.

De todas maneras esta mayor concentración del bioagente presente en el sustrato de las plantas que presentaron agallas en la base de la raíz podría ser una causa de esta anomalía. Recordando lo expresado en la revisión bibliográfica, una de las posibles causas de la formación de agallas en la raíz era el desbalance hormonal a favor de una sobre acumulación de citoquininas a causa del bioagente.

Una mayor concentración de esta hormona en la rizósfera por causa del hongo provocaba una estimulación anormal de la división celular en los tejidos de la raíz con formación de agallas y bajo volumen de raíces laterales. Como consecuencia de esto los plantines no se desarrollan convenientemente y fallan. Este fenómeno se observó en el marco de este trabajo en 2-3% de los plantines bajo estudio.

Otra explicación posible para esta anomalía radicular y que desplaza a *Trichoderma* como causa principal, es la alta variabilidad genética del vegetal mencionada en el ítem anterior. Se cree que un porcentaje de los cruzamientos logrados en los programas de mejoramiento es causante de este fenómeno radicular ya que generan genotipos vegetales susceptibles a las concentraciones de citoquininas del suelo y endógenas generándose como consecuencia la anomalía radicular citada. Este fenómeno también es corroborado en los datos presentados por este trabajo.

El concepto vertido en el párrafo anterior proviene de estudios realizados en híbridos de *Nicotiana tabacum*, en donde se desarrollaron tumores a causa de la inactivación de vías de señalización debido a ciertas combinaciones particulares de genes durante los cruzamientos (Taíz y Zeiger, 2009).

4.10. EVALUACIÓN DE ISOENZIMAS PEROXIDASAS

Las isoenzimas se definen como las distintas formas moleculares de una misma enzima, las cuales presentan la misma especificidad enzimática y actúan sobre el mismo sustrato pero difieren en su movilidad cuando se las somete a ensayos de electroforesis.

Esta técnica estudia las modificaciones que pueden existir en la expresión de determinados genes, en particular de aquellos que codifican proteínas, siendo especialmente útil para evaluar isoenzimas. La evaluación no se basa en la existencia de cambios en la expresión de una proteína, sino en los posibles cambios en la secuencia de nucleótidos que codifican para dicha proteína

Por consiguiente, si estas modificaciones ocurren en algunos de los nucleótidos que codifican para esta enzima en la fase de transcripción, puede existir alguna alteración en los tripletes y esto conlleva que al interior de la enzima la secuencia de aminoácidos sea diferente detectándose este cambio en un campo eléctrico

En el estudio isoenzimático de peroxidasas, se identificaron en las placas de agarosa dos zonas de actividad peroxidasa que corresponden a dos formas diferentes de esta enzima. En este caso la diferencia radica en la segunda banda, donde se observa que ésta migra más al polo positivo por lo tanto es más electronegativa y corresponde a las muestras sin tratamiento.

En el caso de las muestras con tratamiento esta segunda banda migra sensiblemente menos hacia el polo positivo y es por consiguiente relativamente menos electronegativa. Este contraste se visualiza como una mayor separación entre las zonas 1 y 2 en muestras con tratamiento en relación a las muestras testigo que están más juntas. Lo explicado en este párrafo se entenderá mejor al visualizar la figura 10 que corresponde a una de las placas de agarosa obtenida en el ensayo. La figura 11

corresponde a la placa anterior, a la que se le ajustó cambios cromáticos en la imagen a efectos de una mejor identificación de las bandas de migración.

Figura 10: Placa de agarosa donde se visualizan las bandas de migración por tratamiento, indicadas por los números 1 y 2.

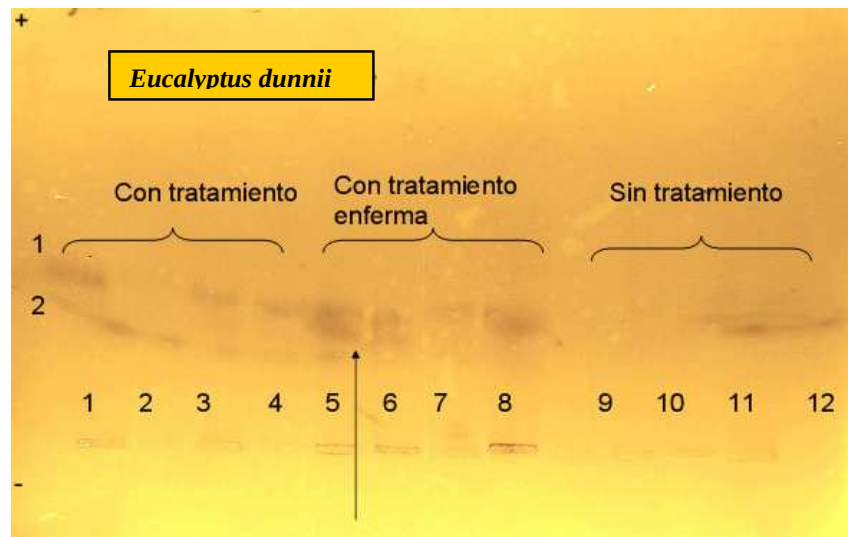
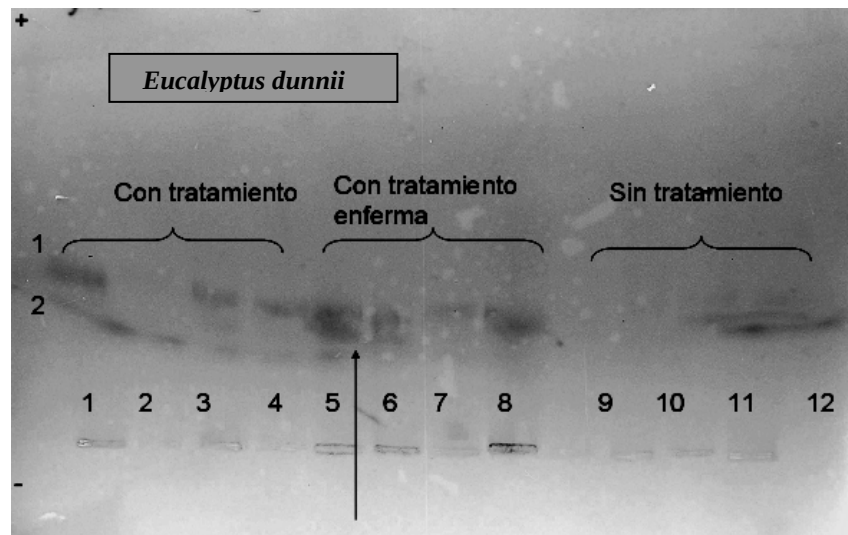


Figura 11: Imagen de la placa anterior pero con ajustes cromáticos donde se visualiza la mayor migración de la banda 2 hacia el polo negativo



Asumiendo que todas las plantas del experimento se obtuvieron de semillas de un mismo origen, es de esperar que todas tengan la misma información genética por encima de la variabilidad genética que pueda existir en la especie. Por lo tanto una posible explicación a la diferencia de migración podría ser que la misma sea originada por la variabilidad genética, pero en este caso se observó que todas las plantas tratadas con el agente poseían un patrón de dos bandas separadas y todas las plantas sin tratamiento poseían un patrón de dos bandas juntas.

Consecuentemente la hipótesis que cabría en este estudio es que en el proceso de fabricación de la proteína, en particular en la etapa que tiene lugar fuera del núcleo, es decir cuando la información que estaba contenida en el núcleo ha sido traducida a ARN mensajero y éste ha migrado al citoplasma, el tratamiento con *Trichoderma* haya afectado de alguna manera la regulación del mecanismo de traducción del ARN mensajero y haya originado cambios en la serie de aminoácidos que han agregado los ARN de transferencia al formar la proteína. Esto podría explicar porque las plantas tratadas tienen una menor migración de banda en el campo eléctrico.

Falta responder por tanto a que se debe qué estos aminoácidos migren menos, o por qué son menos electronegativos los materiales tratados con el agente. Esto se debe a que ha habido algún cambio en la proteína mediada por el agente que originó una sustitución de aminoácidos negativos por positivos (básicos) generando una carga total neta menos electronegativa que migrará menos hacia el polo positivo en un campo eléctrico. Esto ocurre solamente como una reacción al tratamiento con *Trichoderma harzianum* en el momento de la fabricación de la enzima peroxidasa entre la transcripción y la traducción de la proteína en el vegetal.

Esta conclusión concuerda con las realizadas en análisis efectuados por Ezziyyani et al. (2005), que a través de la separación por electroforesis de isoperoxidasas de la fracción soluble de tallos y raíces de pimientos tratados con *T. harzianum*, detectó

isoperoxidasas básicas (o sea, con carga positiva) adicionales únicamente en las raíces y hojas tratadas. El autor concluyó que esto prueba que alguna parte del micelio del hongo actúa como elicitador de este fenómeno.

Si bien en este ensayo las isoperoxidasas ácidas son constitutivas de los tejidos y se presentan también en los tratamientos de control, cabe aclarar que en las hojas tratadas con el agente estas proteínas básicas adicionales son las que presentan mayor actividad y además, según los autores, son proteínas que sólo son inducidas en las hojas tratadas.

Estas modificaciones, por la naturaleza que han tenido, ocurren a causa del tratamiento con *Trichoderma harzianum*. No es de esperar que el agente biológico utilizado en este proceso altere la información genética pero sí el metabolismo de las plantas como ya se ha determinado, sobre todo la actividad peroxidasa que está involucrada en los mecanismos de crecimiento meristemático.

Este concepto es concordante con un efecto sobre los mecanismos de crecimiento celular post transcripcional, o sea, que haya afectado la fase de transducción que es una fase del proceso de formación de la proteína que es muy afectado por el ambiente.

Esto coincide con lo expresado por Clark et al., citados por Ortiz (2007), que expresan que después de reconocer al hongo se desencadenan en el vegetal respuestas de defensa con rápido flujo de iones a nivel de membrana y la consecuente reprogramación transcripcional en donde la modificación post-transduccional de proteínas tiene un papel determinante en las diferentes cascadas de señalización a nivel celular.

Por tanto en este estudio isoenzimático de peroxidadas es lógico al observar las placas que las plantas tratadas posean un patrón de migración de bandas diferentes a las

que no tienen tratamiento, concluyendo entonces que este efecto se debe a la acción de *Trichoderma harzianum* en los mecanismos de síntesis de proteína post transcripcional, que indujo la formación de un tipo diferente de enzima dentro de la familia de las peroxidasas.

5. CONCLUSIONES

Para el ensayo realizado las principales conclusiones son las siguientes:

- Los resultados indican que la aplicación de *Trichoderma harzianum* en sustrato tuvo efecto promotor en el crecimiento de plantines de *Eucalyptus dunnii* evidenciado en todos los parámetros evaluados. Cabe destacar entre estos parámetros los niveles superiores alcanzados por las variables diámetro y altura, mencionadas por ser los índices mas utilizados en viveros, de 31.6 % y 11.3 % respectivamente. En cuanto a lo operativo la asociación con el bioagente permitió comenzar las etapas de clasificación de plantines 3 semanas antes de lo estipulado, así como el descenso en los programas de fertilización de las dosis de nitrógeno aplicadas para estos mismos plantines.
- Se pudo constatar en los análisis isoenzimáticos de peroxidasas que *Trichoderma harzianum*, a nivel endógeno, indujo resistencia a enfermedades en el vegetal. Ya que al alterar la expresión de las isoenzimas mencionadas promueve la formación de un tipo diferente de enzima dentro de la familia de las peroxidasas. Esto conlleva no solo al aumento de moléculas defensivas sino también a formas diferentes de las mismas en la planta.
- La colonización y supervivencia de *Trichoderma harzianum* en sustrato se mantuvo en niveles adecuados a lo largo del ensayo. El rango alcanzado por gramo de sustrato inoculado fue del orden de las $2,2 \times 10^5$ ufc.

6. RESUMEN

Uno de los puntos salientes en el desarrollo forestal que tiene el país es importante también en la cadena forestal es la innovación tecnológica actual de los viveros forestales, los cuales, en el transcurso de estos últimos años han incorporado tecnologías apropiadas para acrecentar los estándares de producción y de calidad. Estas innovaciones se originan a partir de la creciente demanda y exigencia de la industria del sector por la producción de plantines dentro de los parámetros de calidad, uniformidad y sanidad requeridos. En este marco se encuadra la utilización de *Trichoderma harzianum* en viveros forestales como uno de los microorganismos más usados como agente de control biológico y como biopromotor del crecimiento vegetal. Por consiguiente en este trabajo se determinó el potencial y la eficacia de *Trichoderma harzianum* inoculado en sustrato, asociado a plantines de *Eucalyptus dunnii* para promover la calidad de los mismos según los parámetros más importantes utilizados en viveros forestales, a través de la toma de medidas físicas y estudios fisiológicos. En este sentido se realizaron estudios isoenzimáticos de peroxidasas para corroborar la inducción de resistencia a nivel endógeno en la planta por el bioagente. Por otra parte se determinó la capacidad de *Trichoderma harzianum* en la colonización y supervivencia en el sustrato. Los resultados finales de esta tesis indicaron que la aplicación de *Trichoderma harzianum* en sustrato tuvo efecto promotor en el crecimiento de plantines de *Eucalyptus dunnii* evidenciado en todos los parámetros evaluados. En otro orden se pudo constatar en los análisis isoenzimáticos de peroxidasas que *Trichoderma*, a nivel endógeno, indujo resistencia a enfermedades en el vegetal ya que al alterar la expresión de las isoenzimas mencionadas promovió la formación de un tipo diferente de enzima dentro de la familia de las peroxidasas. Por último la colonización y supervivencia de *Trichoderma* en sustrato se mantuvo en niveles adecuados a lo largo del ensayo.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*; Biopromoción; Biocontrol; *Eucalyptus dunnii*.

7. SUMMARY

One of the highlights in forestry development that has the country has and also important in the forest chain and technological innovation today is nurseries, which in the course of recent years have incorporated appropriate technologies to increase standards production and quality. These innovations stem from the increasing demand and requirement of the industry, marked by the production of seedlings within the parameters of quality, consistency and health requirements. In this context, it fits the use of *Trichoderma harzianum* in forest nurseries, as one of the most widely used microorganisms as biological control agent and as biopromotor plant growth. Therefore in this work we have determined the potential and effectiveness of *Trichoderma harzianum* inoculated on the substrate associated with *Eucalyptus dunnii* seedlings to promote their quality as the most important parameters used in forest nursery through physical measures and physiological studies. In addition, studies were conducted to corroborate peroxidase isozyme induction of endogenous resistance on the plant by the bioagente. On the other hand it has been determined the ability of *Trichoderma harzianum* in the colonization and survival of the substrate. The final results of this essay indicate that the application of *Trichoderma harzianum* on substrate had a promoting effect on the growth of seedlings of *Eucalyptus dunnii* evident in all parameters. Moreover it has been found in the isozyme analysis of peroxidase that *Trichoderma* at an endogenous level induces disease resistance in plants and that altering the expression of the referred isozymes promotes the formation of a different type of enzyme within the family peroxidases. Finally, the colonization and survival of *Trichoderma* in the substrate was maintained at adequate levels throughout the essay.

Keywords: *Trichoderma harzianum*; Biopromotion; Biocontrol; *Eucalyptus dunnii*.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AÑÓN, D.; LEVITÁN, A.; TARINO, E. 2004. Evaluación de diferentes dosis de fertilización en la producción de plantines de *Pinus taeda* L. creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 161 p.
2. ARAYA, P. 2005. Evaluación de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. como controlador biológico de *Rhizoctonia* spp. en plantas de remolacha (*Beta vulgaris* var. *saccharífera*) bajo condiciones de invernadero. (en línea). Memoria de título Ing. Agr. Talca, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 38 p. Consultado ago. 2010. Disponible en <http://www.bionativa.cl/pdf/tesis/trichonativa/t44.pdf>
3. BARRIOS, M. 2006. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano. (en línea). Tesis Magíster Scientiae agricultura ecológica. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 68 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://musalit.inibap.org/pdf/IN070513es.pdf>
4. BENEZER, M.; CASTRO, E.; GARCÍA, E. 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología. 26(1): 56-61. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61226109.pdf>

5. BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.; LIMÓN, M.; CODÓN, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. (en línea). International Microbiology. 7(4): 249-260. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-67092004000400003&script=sciarttext>
6. BESOAIN, X. 2005. Control biológico de *Pyrenochaeta Iycopersici* y *Phytophthora nicotianae* en tomates bajo invernadero. (en línea). Santiago, s.e. 14 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/cienciasagronicas/montealegrej/13.html>
7. BORGES, L.; NUNES, G.; LOPES, V. 2004. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. (en línea). Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39(4): 349-355. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.scielo.br/pdf/pab/v39n4/20444.pdf>
8. BRUSSA, C. 1994. Eucalyptus. Montevideo, Hemisferio Sur. 328 p.
9. CÁCERES, P.; BOSCHI, C.; CHÁVEZ, W. s.f. Respuestas a la aplicación de auxinas y citoquininas sobre la calidad de propágulos (estaquillas) de *Fuchsia magellanica* Lam. (Onagraceae) durante el enraizamiento y rusticación en ambientes de temperatura supraóptima. (en línea). s.n.t. 4 p. Consultado abr. 2010. Disponible en <http://www.maa.gba.gov.ar/.../51%5B1%5D.Respuestas%5Calaaplicaciondeauxinasycitoquininas.doc>
10. CAMARENA, G.; DE LA TORRE, R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. (en línea). Revista Chapingo. 13(2): 157-162. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62913209>

11. CÁRDENAS, D. 2003. Evaluación de diferentes sustratos colonizados con el antagonista (*Trichoderma harzianum* Fr.) sobre la calidad de plantines de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex Maiden., *Eucalyptus globulus* spp. *globulus* Labill. y *Pinus taeda* L. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 195 p.
12. CIEF. 1985. Distribución regional y condiciones ecológicas de los eucaliptos cultivados en la Argentina. Problemas inherentes. CIEF. Publicación técnica. no 1. 18 p.
13. CONTRERAS, A., MACÍAS, L., CORTÉS, C., LÓPEZ, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. (en línea). Plant Physiology. 149. 1579-1592. Consultado abr. 2010. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/149/3/1579?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=trichoderma+promote+Growth&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>
14. CÓPPOLA, F.; MENDOZA, G.; REGULES, H. 2000. Caracterización de plantines de *Eucalyptus* y *pinus* desde el punto de vista de la calidad en el Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 105 p.
15. CORTEZZI, M.; KALIL, A.; MEDEIROS, A.; TEVARES, F. 2001. Efeitos da citocininas benzilamino, purina e thidiazuron, na multiplicação “in vitro” de brotações de *Eucalyptus dunnii* maid. (en línea). Pesquisa Florestal. 43. 107-112. Consultado ago. 2010. Disponible en <http://www.cnpf.embrapa.br/publica/boletim/boletarqv/boletim43/graca.pdf>

16. CRUZ, L. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. (en línea). Tesis microbióloga industrial. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias. 148 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>
17. CUBILLOS, J.; VALERO, N.; MEJÍA, L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* degener). (en línea). Agronomía Colombiana. 27(1): 81-86. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://agronomia.unal.edu.co/doc/public/rev/27/v27n1a11.pdf>.
18. CHAMORRO, A.; MARTÍNEZ, S.; FERNÁNDEZ, C.; MOSQUERA, T. 2007. Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* var. *Misty blue*. (en línea). Agronomía Colombiana 25(1): 47-53. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99652007000100006&script=sciarttext>
19. CHÁVEZ, M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). (en línea). Tesis microbióloga industrial. Bogotá, Colombia. Facultad de Ciencias. 178 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
20. DONOSO, E.; LOBOS, G.; ROJAS, N. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. (en línea). Bosque. 29 (1): 52-57. Consultado ago. 2010. Disponible en <http://www.Scielo.cl/pdf/bosque/v29n1/art06.pdf>

21. ESPAÑOL, E.; ZAS, R.; VEGA, G. 2000. Contenidos foliares en macro y micro nutrientes en nueve especies de Eucalyptus en el noroeste español. (en línea). Pontevedra, s.e. 9 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.inia.es/gcontrec/pub/ESPAN1049366968520.pdf>
22. EZZIYYANI, M.; PÉREZ, C.; SID, A.; REQUENA, M.; CANDELA, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). (en línea). Murcia, s.e. 12 p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.invenia.es/idhea/idhea.asp?verb=ListRecords&type=invenia&zona=lista&q=%22universidad+murcia+facultad+biologia%22&searchType=instr&page=3&count=10>
23. _____, M.; REQUENA, M.; CANDELA, M. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. (en línea). Revista Anales de Biología. 27: 143-153. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://revistas.um.es/analesbio/article/view/29941/29141>
24. GALAZ, J. 2001. Evaluación in vitro de la efectividad de *Trichoderma longibrachiatum* como agente biocontrolador de *Alternaria alternata*. (en línea). Tesis Ing. Agr. Talca, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 66 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://dspace.otalca.cl/retrieve/1751/JGalazD.pdf>
25. GARCÍA, E.; ARREOLA, A.; CASTRO, E. 2004. Oxígeno herramienta para fabricar defensas bioquímicas en la planta de chile. (en línea). s.n.t. 5 p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.conacyt.mx/comunicacion/Revista/ArticulosCompleto/pdf/Oxigeno.pdf>

26. GARCÍA, M. 2007. Importancia de la calidad del plantín forestal. (en línea). In: Jornadas Forestales de Entre Ríos (22º, 2007, Concordia, Argentina). Trabajos presentados. s.n.t. pp. 1-10. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/concordia/info/Forestales/contenido/pdf/2007/312.II.GARCIA.pdf>
27. GARCÍA, R.; PÉREZ, R. 2003. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. (en línea). Revista Chapingo. 9(1): 5-10. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=62990101>
28. HERNÁNDEZ, A.; HEYDRICH, M.; VELÁZQUEZ, M.; HERNÁNDEZ, A. 2006. Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología. 24(1): 42-49. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61224107>
29. HERRERA, R. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernadero. (en línea). Santiago, Universidad de Chile. s.p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/cienciasagronomicas/montealegrej/14.html>
30. HOITINK, H.; MADDEN, L.; DORRANCE, A. 2005. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.; interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. (en línea). The American Phytopathological Society. 96(2): 186-189. Consultado mar. 2010. Disponible en http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-01_86

31. INFANTE, D.; MARTINEZ, B.; GONZALEZ, N.; REYES, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. (en línea). Revista Protección Vegetal. 24(1): 14-21. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sciarttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&nrm=iso>.ISSN1010-2752>.
32. LAGE Y CÍA. s.f. Trichosoil. (en línea). Montevideo. s.p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.lageycia.com/indexespanol1111.swf>
33. LAVENDER, D. s.f. Plant physiology and nursery environment; interactions affecting seedling growth. (en línea). s.l., RNGR. 9 p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.rngr.net/search?SearchableText=Plant+Physiology+and+Nursery+Environment%3A+Interactions+%09Affecting+Seedling+Growth>
34. LEE, D.; LAWSON, S.; HUTH, J.; HOUSE, S. 2006. Hardwoods Advice Plantation species profile; Dunn's white gum (*Eucalyptus dunnii*). (en línea). Queensland, s.e. s.p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www2.dpi.qld.gov.au/arduoodsqlld/2610.html>
35. LISBOA, M. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en *Vitis vinifera*. (en línea). Memoria de título Ing. Agr. Talca, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 49 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://dspace.utalca.cl/handle/1950/919>
36. MADRIZ, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. (en línea). Manejo Integrado de Plagas. no. 63: 22-32. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2097E/A2097E.PDF>

37. MARCO, M.; ALLIANI, R.; SANCHEZ, M.; REMBADO, G. 1991. *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus dunnii* en la región mesopotámica y su zona de influencia. (en línea) In: Jornadas Forestales de Entre Ríos (1991, Entre Ríos, Argentina). Trabajos presentados. s.n.t. pp. 83-97. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/forestacion/biblos/pdf/1991/38-1991-05.pdf>
38. MICHEL, A.; REBOLLEDO, O.; LEZAMA, R.; OCHOA, M.; MESINA, J.; SAMUELS, G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. (en línea). Revista Mexicana de Fitopatología. 19(2): 154-160. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61219204>
39. _____.; OTERO, M.; MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ, N.; ARIZA, R.; BARRIOS, A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. (en línea). Revista Chapingo. 14(2): 185-191. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.chapingo.mx/.../ca57c7e1a91cc3466b351c72826c0452.pdf>
40. MOLINA, G.; ZALDUA, S.; GONZALEZ, G.; SANFUEENTES, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. (en línea). Bosque. 27(2): 126-134. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S717-920020060002000007&script=sciarttext>
41. MONDINO, P.; VERO, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 158 p.

42. MORENO, A. 2006. Aplicaciones biológicas del gen *aff* (antifungal protéin) de *Aspergillus giganteus* para la protección de plantas frente a infección de patógenos. (en línea). Memoria doctor biotecnología. Barcelona, España, IBMB-CSIC. 106 p. Consultado mar 2010. Disponible en <http://www.tdx.cat/TDX-0326107-124601>
43. NEGRONE, C.; LEÓN, M.; VILLALBA, N. 2008. Evaluación del comportamiento de plantines de *Pinus taeda* L. con y sin aplicación de fertilización starter creciendo en sustrato con *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 60 p.
44. OBRADITH, C.; HIGUERA, B.; MARTÍNEZ, S. 2009. Inducción de actividad peroxidasa y de fenoles totales como respuesta del fruto de lulo (*Solanum quitoense* L.) al patógeno causal de la antracnósis. (en línea). Revista Colombiana de Química. 38(1): 25-42. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28042009000100002&script=sciarttext>
45. OCHOA, M. 2002. Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (hiphomicetes:hyphales), sobre *Mycosphaerella fijiensis* (loculo ascomycetes: dothideales). (en línea). Tesis Master Ciencias biotecnología. Tecomán, México, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 102 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://digeset.ucol.mx/tesis.../Maria%20Elena%20choa%20Moreno.pdf>
46. ORTEGA, U.; KINDELMAN, A.; HEVIA, A.; ÁLVAREZ, E.; MASADA, J. 2006. Control de calidad de planta forestal. (en línea). Asturias, Serida. s.p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=1521&anyo=>

47. ORTIZ, M. 2007. Caracterización funcional de map quinasas del subgrupo c1 de plantas. (en línea). Tesis doctor farmacia. Valencia, España. Facultad de Farmacia. 201 p. Consultado mar 2010. Disponible en <http://www.tdr.cesca.es/TDX-06 04108-122202/>
48. PALMA, F. 2009. Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en la simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino. (en línea). Tesis doctor ciencias biológicas. Granada, España. Facultad de Ciencias. 421 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/18323133.pdf>
49. POLLA, M. s.f. El proceso de desarrollo forestal y agroforestal en la República Oriental del Uruguay. (en línea). In: Congreso Latinoamericano IUFRO(1º,1998, Valdivia). El manejo sustentable de los recursos forestales. Trabajos presentados. Montevideo, MGAP. 11 p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/forestal/EL%20Proceso%20Desarr%20Forestal%20y%20Agroforestal%20en%20ROU.pdf>
50. RACHID, C. 2008. “SAG eucalyptus”; un nuevo sistema de apoyo a la gestión de plantaciones de Eucalyptus orientadas a la producción de celulosa. Revista INIA Uruguay. no. 15: 35-37.
51. RESQUÍN, F. 2003. Evaluación de varias fuentes de semilla de *Eucalyptus dunnii*. En: Avances en investigación y transferencia de tecnología en zona de prioridad forestal 8. Revista INIA Uruguay. no. 321: 21-24.
52. RIVEROS, A.; ROSALES, F.; POCASANGRE, L. 2004. Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. (en línea). In: Reunión Internacional Acorbat (16o., 2004, Oaxaca, México). Trabajos presentados. s.n.t. pp. 361-366. Consultado mar.

2010. Disponible en <http://bananas.bioversityinternational.org/files/files/pdf/.../acorbat04.pdf>

53. RODRÍGUEZ, Y. 2005. Aspectos relacionados con la base bioquímica de la simbiosis micorrízica arbuscular. (en línea). Revista Cultivos Tropicales. 26(1): 11-19. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.inca.edu.cu/otrasweb/revista/pdf/2005/1/CT26106.pdf>
54. ROMERO, G.; MARIUS, N. 2002. Deficiencias de nutrientes en eucaliptus. Montevideo, Facultad de Agronomía. 10 p.
55. _____. 2004. Enfermedades forestales en el Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía. 47 p.
56. SÁNCHEZ, T.; ALDRETE, A.; CETINA, V.; LÓPEZ, J. 2008. Caracterización de medios de crecimiento compuestos por corteza de pino y aserrín. (en línea). Revista Madera y Bosques. 14(2): 41-49. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61711316004>
57. SAUCEDO, M.; GAVILANES, M. 2005. Las map cinasas; elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. (en línea). Revista de Educación Bioquímica. 24(1): 4-11. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/490/49024102.pdf>
58. SERRANO, L; GALINDO. E. s.f. Control biológico de organismos fitopatógenos; un reto multidisciplinario. (en línea). Revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias. 58(1): s.p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://revistaciencia.amc.edu.mx/index.php?option=comcontent&task=view&id=81&Itemid=43>

59. SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, LL. 2004. Involvement of jasmonic acid /ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. (en línea). The American Phitopathological Society. 95(1): 76-84. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0076>
60. SMITH, H.; HENSON, M. 2004. Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 3; tree improvement of *Eucalyptus dunnii* Maiden. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://business.highbeam.com/436220/article-1G1-196825517/achievements-forest-tree-genetic-improvement-australia>
61. SOTO, M.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; VERDIER, V.; THOME, J. 2006. Análisis de expresión génica durante la respuesta de defensa de la yuca a la bacteriosis vascular (*Añublo bacteriano*). (en línea). Revista Colombiana de Biotecnología. 8(2): 16-28. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/511>
62. TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2006. Plant physiology. Sunderland, Massachusettes, Sinauer Associates. 764 p.
63. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN GENERAL FORESTAL. DIVISIÓN ESTADÍSTICAS. 2008. Superficie forestada 1975-2008 registrada en Dirección General Forestal con plan de manejo. (en línea). Montevideo. 1 p. Consultado feb. 2010. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/Forestal/DGF.htm>
64. VILLEGAS, A. s.f. *Trichoderma* pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado mar.

2010. Disponible en <http://www.oriusbiotecnologia.com/portal/content/view/12/7/>

65. VON WERNICH, M.; LAVADO, R.; PORCELLI, C. s.f. Preparando los plantines. Dos valiosas propiedades: velocidad de crecimiento y alta rustificación. (en línea). s.n.t. 3 p. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.fertilizando.com/articulos/Preparando%20los%20Plantines.asp>
66. WOO, S.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. 2005. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. (en línea). The American Phytopathological Society. 96(2): 181-185. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0181>