

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE
PLANTINES DE *Pinus taeda* L. CON Y SIN APLICACIÓN
DE FERTILIZACIÓN STARTER CRECIENDO EN
SUSTRATO CON *Trichoderma harzianum***

por

Carola NEGRONE MARTÍNEZ

María Inés LEÓN RADÍO

Noel VILLALBA MELNECIUC

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2008

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. Graciela Romero

Ing. Agr. Claudine Folch

Ing. Agr. Pedro Mondino

Fecha: -----

Autor: -----

Carola Negrone Martínez

María Inés León Radío

Noel Villalba Melneciuc

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todo el personal de la empresa Colonvade SA, Ing. Agr. Juan Pedro Posse, a Guadalupe Romano, a nuestra directora de tesis Ing. Agr. Graciela Romero, Ing. Agr. Claudine Folch, Ing. Agr. Pedro Mondino, Laboratorio LAGE y Compañía, Ing. Agr. Oscar Bentancur, Lic. Sully Toledo.

A nuestras familias que nos apoyaron incondicionalmente, a Tito, Fede, Juan Martín, Antonio y a todos aquellos que de alguna manera nos acompañaron en nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
 1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	 1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE <i>Pinus taeda</i> L..	4
2.1.1 <u>Descripción de la especie</u>	4
2.1.2 <u>Requerimientos nutricionales de la especie <i>Pinus taeda</i></u>	4
2.1.3 <u>Distribución en el lugar de origen</u>	6
2.1.4 <u>Producción de <i>Pinus taeda</i> en Uruguay</u>	7
2.2 CONCEPTO DE CALIDAD DE LA PLANTA FORESTAL.....	10
2.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>Trichoderma harzianum</i>	10
2.3.1 <u>Clasificación taxonómica</u>	10
2.3.2 <u>Historia y evolución</u>	11
2.3.3 <u><i>Trichoderma</i> como agente de biocontrol</u>	12
2.3.4 <u>Requerimientos nutricionales de <i>Trichoderma harzianum</i></u>	13
2.3.5 <u>Factores que afectan el desarrollo y la supervivencia de <i>Trichoderma</i></u>	13
2.3.5.1 Humedad.....	13
2.3.5.2 pH.....	13
2.3.5.3 Temperatura.....	14
2.3.6 <u>Mecanismos de biocontrol de <i>Trichoderma</i></u>	14
2.3.6.1 Inactivación de enzimas del patógeno.....	14
2.3.6.2 Competencia.....	15
2.3.6.3 Antibiosis.....	16
2.3.6.4 Producción de enzimas.....	16
2.3.6.5 Resistencia inducida.....	17
2.3.6.6 Micoparasitismo.....	17
2.3.7 <u>Biopromoción de crecimiento por <i>Trichoderma harzianum</i></u>	18
2.3.8 <u>Protección de semillas contra el ataque de hongos patógenos</u>	18
2.3.9 <u>Efectos adversos de <i>T. harzianum</i> como agente de biocontrol</u>	18
2.3.10 <u>Caracterización de la principales enfermedades controladas por <i>Trichoderma harzianum</i></u>	19
2.3.10.1 Damping off.....	19
2.3.10.2 Moho gris.....	19
2.4 PEROXIDASAS.....	22
2.5 TRICHOSOIL ®.....	25

2.6 USO DE CORTEZA DE PINO COMO COMPONENTE DE SUSTRATO UTILIZADO.....	27
2.6.1 <u>Componentes de la corteza</u>	27
2.6.2 <u>Composición química de la corteza</u>	28
2.6.2.1 Constituyentes orgánicos.....	28
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	30
3.1 LUGAR, ÉPOCA Y DURACIÓN DEL ENSAYO.....	30
3.2 INVERNÁCULO.....	30
3.3 SUSTRATO.....	31
3.4 TRICHOSOIL®.....	31
3.5 BANDEJAS.....	31
3.6 SEMILLAS.....	31
3.7 SIEMBRA.....	32
3.8 RIEGO.....	32
3.9 FERTILIZACIÓN.....	33
3.10 TRATAMIENTOS.....	34
3.11 DISEÑO ESTADÍSTICO.....	34
3.11.1 <u>Muestreo</u>	35
3.11.1.1 Sustrato.....	35
3.11.1.2 Plantines.....	35
3.12 MEDIDAS REALIZADAS.....	36
3.12.1 <u>En sustrato</u>	36
3.12.2 <u>Plantines</u>	37
3.12.2.1 Análisis foliar.....	37
3.12.2.2 Mediciones morfológicas.....	37
3.12.2.3 Mediciones fisiológicas.....	37
3.12.3 <u>Análisis de la actividad de las peroxidasas</u>	38
3.13 OTRAS CONSIDERACIONES.....	38
3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	40
4.1 VARIABLE ALTURA.....	40
4.2 VARIABLE DIÁMETRO.....	42
4.3 PESO FRESCO DE PARTE AÉREA.....	43
4.4 PESO FRESCO DE PARTE RADICULAR.....	44
4.5 PESO SECO DE PARTE AÉREA Y RADICULAR.....	45
4.6 ANÁLISIS FOLIAR.....	48
4.7 NIVEL DE <i>Trichoderma harzianum</i> EN EL SUSTRATO.....	51
4.8 PEROXIDASAS.....	51
4.9 CORRELACIONES.....	53
5. <u>CONCLUSIONES</u>	54

6. <u>RESUMEN</u>	55
7. <u>SUMMARY</u>	56
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	57
9. <u>ANEXOS</u>	60

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Concentraciones foliares de nutrientes en plantines de <i>Pinus taeda</i>	5
2. Diferentes especies de hongos fitopatógenos controlados con <i>Trichoderma harzianum</i>	21
3. Programa de fertilización aplicado.....	33
4. Tratamientos planteados en el ensayo.....	34
5. Altura promedio y error estándar según tratamientos....	41
6. Contrastes para la variable altura.....	41
7. Diámetro promedio y error estándar según tratamientos.....	43
8. Contrastes para la variable diámetro.....	43
9. Peso fresco de parte aérea promedio y error estándar según tratamientos.....	44
10. Contrastes para la variable peso fresco parte aérea.....	44
11. Peso fresco parte radicular promedio y error estándar según tratamientos.....	45
12. Contrastes para la variable peso fresco parte radicular.....	45
13. Peso seco parte aérea promedio y error estándar según tratamientos.....	46
14. Contrastes para la variable peso seco parte aérea.....	46
15. Peso seco parte radicular promedio y error estándar según tratamientos.....	

16. Datos promedio de los muestreos para 2 fechas de análisis foliares presentados como contrastes.....	47
17. Concentraciones foliares de nutrientes en plantines de <i>Pinus taeda</i>	48
18. Datos promedio de los muestreos para las 2 fechas de análisis foliar y sus contrastes.....	50
19. Nivel de Trichoderma en el sustrato.....	51
20. Actividad peroxidasa (UE/gr de material fresco utilizado).....	52
21. Actividad peroxidasa (UE/mg de proteína extraída....	52
22. Gráfica de UE/mgde proteína extraída según tratamientos.....	52
23. Correlaciones entre actividad peroxidasa y las variables medidas	53

Figura No.

1. Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa L1.....	12
2. Representación esquemática del orden temporal de la actividad de las defensas de la planta.....	23
3. Foto del interior del invernáculo.....	30
4. Foto del carro móvil que realiza el fertirriego.....	32
5. Diseño del ensayo presentando los bloques.....	35
6. Foto de los tratamientos.....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTOS GENERALES

El sector forestal uruguayo comienza a tomar importancia a partir del año 1989, con la creación de la ley forestal (N° 15.939), la cual promovió la producción de árboles de determinadas especies, entre ellas el género *Pinus sp.* El país alcanzó de esta manera una masa crítica de plantaciones forestales que permitió la conformación de polos de producción e industrialización.

Los datos más recientes aportados por la Dirección Forestal muestran que la superficie total forestada es de 1.524.897 hás, de las cuales el género *Pinus* bajo proyecto ocupa 173.075 hás. (URUGUAY. MGAP. DF, 2007).

El desarrollo del sector ha revelado la existencia de una gran demanda tecnológica en todas las etapas de la cadena de la madera, según sus diferentes destinos (pulpa, aserrado y energía). Esta brecha tecnológica se ha ido acentuando en los últimos años por la dinámica adquirida del sector y por las propias características de la investigación forestal, condicionada por la longitud del ciclo biológico de los árboles.

Se ha observado un gran cambio en la forma de producción de plantines, concentrándose la adquisición de tecnología en las grandes empresas dedicadas a esta etapa, lográndose una buena calidad de plantín en un periodo de tiempo de 5 a 6 meses, con la utilización de sustratos compostados, riego y fertilizaciones periódicas.

El uso de sustratos inocuos ayudó a la disminución de la aparición de microorganismos patógenos para las plantas, como los causantes de enfermedades por ejemplo “damping off” o caída de almácigos, como sucedía cuando se usaban mezclas con tierra. También se logra una homogeneidad en caracteres morfológicos en plantines con mínimas pérdidas de ellos.

Dentro de los factores que actúan en las etapas de la cadena de producción, se ha hecho hincapié en estos últimos años, en disminuir la utilización de agroquímicos, con el fin de que el medio ambiente se vea menos afectado por la contaminación de éstos. Esto ha llevado a la investigación de nuevas alternativas, como ser el control biológico de fitopatógenos en la etapa de vivero, ya que es muy común la aparición de éstos debido a las condiciones de humedad y temperatura en el invernáculo.

El control biológico se concibe dentro de un plan de Manejo Integrado, agregado a un conjunto de medidas que tienen en cuenta el seguimiento de las poblaciones de los patógenos a través de monitoreos. Sin embargo, antes que el control biológico llegue a

ser un componente importante en el manejo de enfermedades de plantas, éste debe probar ser efectivo, confiable, consistente y económico (Añón et al., 2004).

Es sabido que el género del hongo *Trichoderma*, mas específicamente la especie *Trichoderma harzianum* actúa controlando a hongos que forman parte del complejo “damping off”, como ser *Pythium ultimum* Trow, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium spp*, *Sclerotinia spp*, *Fusarium oxysporum* Schlecht.

También otra enfermedad de gran importancia controlada por este agente es el “moho gris” causado por *Botrytis cinerea*.

Asumiendo que la cepa de *Trichoderma harzianum* usada en este ensayo puede ser utilizada con objetivos de biocontrol y biopromoción del crecimiento, el presente trabajo intenta evaluar el efecto promotor de crecimiento de plantines de *Pinus taeda* y su posible efecto como inductor de resistencia.

Para este último fin se llevó a cabo la determinación de la actividad enzimática de peroxidasas, como ejemplo de una de las proteínas pertenecientes a los mecanismos de defensa.

En el país se cuenta con los medios para analizar esta enzima y no para otras que también tienen actividad relacionada con los mecanismos de defensa inducidas por *Trichoderma*.

El ensayo fue realizado en el vivero “La Buena Unión” de la empresa Colonvade S.A., ubicado en Ruta N°5, Km. 456, en el Departamento de Rivera. Esta empresa se dedica fundamentalmente a la producción de plantines de pino.

Como punto importante, se busca la optimización en el proceso que realiza, para lograr buena calidad de plantín y producción homogénea con disminución de agroquímicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la aplicación de un biocontrolador y biopromotor en plantas de *Pinus taeda* creciendo en vivero en sustrato inoculado con *Trichoderma harzianum*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Observar si *Trichoderma harzianum* promueve el crecimiento de plantines de *Pinus taeda*.
- Estudiar la viabilidad de sustituir la fertilización starter por aplicación de *Trichoderma harzianum*.

- Explorar la posibilidad de que *Trichoderma* induzca resistencia en las plantas midiendo la producción de peroxidasas.
- Determinar la colonización y sobrevivencia de *Trichoderma harzianum* en sustrato, durante el ciclo de producción de plantines de *Pinus taeda*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE *Pinus taeda*

2.1.1 Descripción de la especie

Pinus taeda Linnaeus (*Pinus lutea* Walter), “Loblolly pine” o pino americano es uno de los cuatro principales pinos del sudeste de los Estados Unidos (Bonifacino et al., citados por Añón et al., 2004).

Sus características morfológicas son:

- Árbol de gran porte, alto, derecho, que alcanza en el país de origen unos 50m de altura con un diámetro de hasta 1.8 m.
- Copa piramidal con ramas inclinadas hacia abajo.
- Corteza de color castaño rojiza a canela profundamente surcada con placas oblongas, chatas, gruesas, fuertemente apretadas, con un espesor de 1.5 a 2.5 cm.
- Hojas de 15-20cm de largo, agrupadas en hacecillos de 2 a 3 acículas con vaina persistente.
- Conos sésiles en número de 2 a 4, oblongos a cilíndricos-ovoides, color rojizo claro, con escamas fructíferas delgadas y mucrón provisto de espina.
- Semilla alada de forma romboidal, 2.5 mm de largo; presenta tegumento castaño oscuro a veces con manchas negras (Burmidad et al., citados por Añón et al., 2004).

2.1.2 Requerimientos nutricionales de la especie *Pinus taeda*

En este ítem se consideran aquellos elementos nutricionales que son esenciales para el desarrollo y la obtención de un plantín de buena calidad. Éstos son los tomados en cuenta por la empresa al momento de fertilizar. Los elementos son: nitrógeno, fósforo y potasio.

Por el notorio efecto de la fertilización en el crecimiento de las plantas, los niveles de nutrientes son ajustados para las distintas etapas de desarrollo de los plantines.

Estas etapas se pueden separar en tres fases: la fase de establecimiento (arranque) que abarca emergencia y crecimiento del plantín; la fase de rápido crecimiento (cría) que involucra la etapa exponencial de crecimiento y la fase de endurecimiento o rustificación (terminación) en la cual aparece el brote terminal, el crecimiento exponencial cesa y existe un incremento del desarrollo de las raíces.

En la primera etapa mencionada el elemento fundamental aplicado en mayor dosis es el fósforo y tiene diferentes funciones en la planta, pero una de las más importantes es su rol en el almacenamiento y transferencia de energía obtenida de la fotosíntesis y del metabolismo de los carbohidratos. Dicha energía es almacenada hasta su utilización, en un compuesto conocido como adenosin trifosfato (ATP) (Hernández, 1999).

En la segunda fase la mayor incorporación es la de nitrógeno, la cual promueve el desarrollo foliar y en altura de los plantines.

El nitrógeno juega un rol esencial en el crecimiento vegetal, ya que es constituyente de moléculas como: clorofila, aminoácidos esenciales, proteínas, enzimas, nucleoproteínas, hormonas, adenosin trifosfato, etc. Las plantas requieren nitrógeno en muy altas cantidades, solo comparables a las del potasio.

La tercera etapa de la fertilización se realiza agregando una buena cantidad de potasio, lo cual favorece su rusticación preparando al plantín para ser llevado a campo. Aunque el Potasio no forma parte estructural de la planta, son requeridas grandes cantidades de este nutriente para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que tiene función de estabilizador del pH y osmoregulador, es necesario para la síntesis de proteínas y carbohidratos. Actúa como activador de numerosas enzimas y participa en la apertura y cierre estomático (Dell, citado por Cabrera y Tejera, 2002).

El potasio, por otra parte, está asociado a los mecanismos de defensa de la planta contra las enfermedades. La incidencia y severidad del ataque producido por hongos fitopatógenos se reduce notoriamente en plantas que tienen buen aporte de potasio.

Cuadro 1: Concentraciones foliares de nutrientes en plantines de *Pinus elliottii*

Nutriente	Rango típico ¹
N (%)	0,8-1,2
P (%)	0,085-0,09
K (%)	0,25-0,3
B (ppm)	4,0-8,0

¹: Rangos óptimos aproximados para concentraciones foliares en *P.elliottii* (Pritchett, citado por Cárdenas, 2003).

2.1.3 Distribución en el lugar de origen

Pinus taeda presenta un amplio rango de distribución, se encuentra en rodales puros y es la principal especie comercial del sureste de Estados Unidos, excepto en Florida donde *Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii* prevalece. Es la especie dominante en cada uno de los estados de la costa atlántica y del golfo de México, además del sur de New Jersey.

Los árboles crecen mejor en suelos profundos de drenaje imperfecto. Se desarrollan desde el nivel del mar, hasta elevaciones de 640 metros al norte de Alabama y Georgia; las precipitaciones anuales oscilan entre 1000 y 1500mm y las temperaturas entre -23 y 38 °C.

La limitación de la extensión de la especie se debe a la temperatura baja en el norte y en el oeste a la escasez de lluvias (Burmidad et al., citados por Añón et al., 2004).

Pinus taeda es uno de los principales pinos del sur de Estados Unidos y presenta las siguientes ventajas para plantación en nuestro país:

- amplio rango de dispersión natural
- alto rendimiento
- facilidad de extracción de semilla, limpieza y conservación de la misma
- facilidad de manejo en el vivero
- adaptabilidad a gran variabilidad de sitios (incluyendo suelos marginales) y relativa resistencia a daños por heladas

Entre las desventajas se destacan:

- conos difíciles de separar de los árboles y costosa recolección
- la semilla está sujeta a dormancia y frecuentemente requiere tratamientos especiales para estimular su germinación
- presenta susceptibilidad a *Rhyacionia bowliana*, insecto que ataca a los brotes nuevos

En el área de distribución natural de *Pinus taeda*, a diferencia de lo que sucede en Uruguay, las precipitaciones se distribuyen uniformemente en las cuatro estaciones del año, las temperaturas son más extremas, en especial las mínimas de invierno, siendo por lo tanto favorecida esta especie con las temperaturas de nuestro país (Burmidad et al., citados por Añón et al., 2004).

2.1.4 Producción de *Pinus taeda* en Uruguay

Pinus taeda es en Uruguay una de las especies forestales introducidas que más se ha plantado en las últimas décadas. La excelente adaptabilidad y comportamiento que ha demostrado tener en nuestras condiciones, la ubican como una de las especies para el presente y futuro desarrollo forestal (Burmidad et al., citados por Añón et al., 2004).

El cultivo de esta especie tiene como objetivo de producción en nuestro país, la obtención de madera de calidad para aserrado, fabricación de tableros contrachapados (plywood), ya sea para uso nacional y en mayor porcentaje para la exportación.

La producción se concentra en el norte del país, principalmente en los departamentos de Rivera y Tacuarembó, donde las condiciones de suelo son las más favorables y también allí se concentran las industrias (aserraderos, plantas de debobinado).

2.2 CONCEPTO DE CALIDAD DE LA PLANTA FORESTAL

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

Las plantas llevadas a campo deben tener un buen arraigamiento y buen crecimiento según el sitio de plantación.

Se deben realizar tareas de mantenimiento como ser la limpieza de malezas, para disminuir la competencia por lugar, nutrientes y agua con los plantines.

Una planta de mala calidad, ya sea que tenga altura insuficiente, baja densidad de raíces, o presencia de torceduras a nivel de tallo, ocasiona en plantación problemas como son: la mayor reposición, bajos crecimientos y posteriormente una alteración en la producción estimada del rodal. Uno de los problemas de esta baja calidad, puede ser que no se adapte al sitio de la plantación o no ser morfológicamente o fisiológicamente adecuada.

Como forma de asegurar la adaptabilidad a las condiciones de nuestro país, las semillas de las cuales se obtendrán las plantas deben haber sido probadas anteriormente en un ensayo de orígenes o saber realmente si son buenas para el sitio a plantar.

Por lo mencionado anteriormente y a modo de sintetizar, se pueden considerar los siguientes parámetros para evaluar calidad de planta forestal:

- Edad: las plantas jóvenes tienen gran cantidad de raíces, lo que asegura un buen arraigamiento al momento de la plantación final. La edad está muy relacionada a la altura, se considera que un plantín con 25cm de parte aérea está pronto para plantación.¹

Como ventaja de una buena altura se menciona que le permite a la planta competir con la vegetación herbácea y arbustiva que la rodea (Coppola et al., 2000). Es un indicador que por si solo es de poco valor para evaluar la calidad de la planta, sin embargo, si se combina con el diámetro, mediante alguna relación puede ser un indicador importante (Coppola et al., 2000).

- Diámetro de cuello: es el parámetro de mayor utilidad para evaluar la calidad de plantines, ya que puede reflejar el tamaño del sistema radical y la durabilidad de la planta (Coppola et al., 2000). Investigaciones realizadas por Stoekler y Slabaugh (1965), Schubert y Adams (1971), han demostrado fuerte correlación entre el diámetro del cuello y la sobrevivencia de los plantines, después de la plantación (Cárdenas, 2003). Los valores entre 3 y 4 mm de diámetro de cuello son los seleccionados para plantación.¹

- Equilibrio parte aérea/parte radicular: en general se indica, que lavada la planta y secada al aire, el peso de la parte aérea no debe duplicar el peso de la parte radicular.

Cuando las condiciones en el vivero no son las requeridas por las plantas se pueden observar cambios en su fisonomía, por ejemplo, una planta con poca raíz está creciendo en condiciones de anegamiento, por otro lado una planta con escasas hojas indica una falta de luz o nutrientes (Montoya y Cámara, 1996). Esto llevará a problemas de arraigamiento en plantación y posterior reposición.

- Forma de la raíz: ésta debe ser fasciculada, con cantidad abundante de raíces secundarias para que la planta haga una buena absorción de agua y nutrientes. La forma ideal es recta, colgante, sin enroscamientos y sin lastimaduras (Coppola et al., 2000).

- Longitud de la raíz: es difícil determinar una longitud tipo, pero como ejemplo, una raíz larga dificulta y encarece la plantación, en cambio, una raíz corta expone a la planta a la sequía por no tener capacidad de exploración en el suelo para la absorción de agua.

¹ Posse J.P.2007. Com. personal

- Estado sanitario: las plantas deben encontrarse con una coloración típica; coloraciones anormales indican exceso o déficit de nutrientes ó presencia de algún organismo patógeno.

La presencia de heridas pueden originar sitios de entrada de bacterias y hongos, por lo cual, plantas dañadas serían descartadas para llevar a campo, ya que si no están atacadas en vivero puede ser probable que ocurra un ataque posteriormente.

- Arquitectura de la planta: es la forma en que se disponen el tallo, las ramas y el follaje de acuerdo con el sistema radical. Dicha arquitectura tiene un fuerte componente genético, por lo que deben producirse genotipos seleccionados para lograr una adecuada productividad (Coppola et al., citados por Añón et al., 2004).

Una planta con buena conformación presenta: tallo recto, no bifurcado (monopodial), sin daños, acículas verdaderas (presencia de vaina basal) de color verde intenso.

- Grado de rustificación: debe ser medio, ya que una planta muy rustificada tiene baja tasa de crecimiento inicial en el campo, pero no sufre tanto la falta de agua como una planta suculenta, que tiene como ventaja un mayor desarrollo inicial (Coppola et al., citados por Añón et al., 2004).

- Micorrización: Existen numerosas relaciones mutualísticas entre hongos y raíces de plantas vasculares y no vasculares. Una de las más extendidas la constituyen las asociaciones micorríticas, que involucran varios tipos de hongos del suelo y raíces. La especie *Pinus taeda* necesita de esta asociación para su normal crecimiento.

El tipo de micorrizas que se asocian con el género *Pinus* son las ectomicorrizas, las cuales presentan ciertas características:

- Se presentan como un manto fúngico alrededor de las raíces, hifas intercelulares, formando una red (red de Hartig) entre las primeras células corticales y un conjunto de filamentos miceliares. Estos filamentos exploran el suelo para asegurar la nutrición mineral de la asociación (Frioni, 2006).
- Las hifas del hongo no penetran en el interior de las células de la raíz, si no que se ubican sobre y entre las separaciones de éstas. Este tipo de micorrización es el que predomina entre los árboles de zonas templadas, siendo especialmente característico en pinos, hayas y robles. Los hongos son tanto *Basidiomycota* como *Ascomycota*.

2.3 CARACTERÍSTICAS DE *Trichoderma harzianum*

2.3.1 Clasificación taxonómica

- Reino MYCETAE (Hongo superior)
- División EUMYCOTA
- Subdivisión DEUTEROMYCOTINA Hongos imperfectos (hongos asexuales)
- Clase HYPHOMYCETES
- Orden HYPHALES (MONILIALES), las esporas asexuales se forman sobre las hifas (o en su interior) y se encuentran expuestas libremente a la atmósfera
- Género *Trichoderma*
- Especie *Trichoderma harzianum*
(adaptado de Agrios, 1995).

2.3.2 Historia y evolución

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* están mundialmente presentes y son fácilmente aisladas del suelo, madera en descomposición y en otras formas de materia orgánica. Ellas son clasificadas como hongos imperfectos que raramente presentan etapa sexual. La etapa sexual, cuando está presente, se encuentra como hongos Ascomycetes en el género *Hypocrea*.

La taxonomía tradicional está basada en las diferencias morfológicas, principalmente en el aparato de esporulación asexual; en la actualidad ya se están empleando técnicas moleculares para la identificación y clasificación de los organismos. Consecuentemente la taxa ha ido de nueve a treinta y tres especies.

Dentro del género *Trichoderma*, las cepas silvestres se adaptan con facilidad y pueden ser heterocarióticas (núcleo de distinto genotipo dentro de un mismo organismo), las cepas comerciales usadas para control biológico pueden ser homocarióticas (núcleos similares o idénticos). Este aspecto, en conjunto con el control estricto de la variación a través de la deriva genética, permite que las cepas comerciales no presenten mayor variabilidad (Añón et al., 2004).

Las colonias tienen rápido crecimiento y las esporas (conidios) se presentan de color verde característico del género. El reverso de las colonias es incoloro, amarillento, verde-amarillento, y muchas especies producen clamidosporas, esporas de resistencia, que se forman por engrosamiento de la pared de las células del micelio.

Este hongo saprófito, forma estructuras de resistencia denominadas clamidosporas intercalares o terminales en cortas ramificaciones, las cuales son unicelulares, pero pueden fusionarse entre dos o más de forma subglobosa, elipsoidal o periforme, de coloración subhialinas a amarillentas, de 4 a 12 μm de diámetro, con una pared de 1 μm de espesor (Bissett, citado por Cabrera et al., 2002). Estas son estructuras que permiten sobrevivir y persistir de un año a otro a hongos en el suelo y por su naturaleza representan la forma de propagación más efectiva (Lewis y Papavizas, citados por Cárdenas, 2003).

2.3.3 Trichoderma como agente de biocontrol

El potencial de *Trichoderma* en el control de enfermedades fue descubierto en 1930 por Richard Weindling y en los siguientes años se ha sumado el control de muchas otras patologías.

En los 80' Baker en la Universidad de Colorado y Chet en Israel demostraron que cepas de *Trichoderma harzianum* tenían la habilidad de promover el crecimiento de las plantas y que este efecto estaba aparentemente separado de su habilidad como bicontrolador (Harman y Kubicek, 1998).

Esto ha llevado a su uso en la producción comercial para muchos cultivos en EEUU, con mezclas de especies del mismo género en otros países (Howell, 2003).

En la última década se ha utilizado en Uruguay productos comerciales a base de *Trichoderma* para el control de enfermedades en vivero, principalmente hortícola. Hoy en día también se está implementando en viveros forestales.

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al. 1999, Ezziyyani et al. 2003).

También se sabe que la inducción localizada de muerte celular, en el lugar de infección de la planta hospedadora, está acompañada por una activación transcripcional de genes de defensa que codifican la síntesis de metabolitos antimicrobianos y proteínas. Estas reacciones han sido confirmadas al demostrarse que no sólo los patógenos atenuados son capaces de inducir reacciones de resistencia en las plantas, sino también los microorganismos saprófitos agentes de biocontrol entre ellos los pertenecientes al género *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Smith et al., Van Peer et al., Maurhofer et al., Benhamou y Chet, Ongena et al., Ezziyyani et al., citados por Ezziyyani et al., 2004).



Figura 1: Cultivos de *T. harzianum* cepa L1 aislada por Lage y cía.

Trichoderma produce enzimas (quitinasas, glucanasas, proteasas) inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser un eficiente agente de control. De igual forma pueden sobrevivir en medios conteniendo herbicidas, fungicidas y pesticidas como DDT. Además su gran variabilidad se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos.

Trichoderma, toma nutrientes de los hongos (a los cuales degrada) y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostaje favorecen su desarrollo ya que le proporcionan nutrientes.

2.3.4 Requerimientos nutricionales de *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum es un hongo aerobio obligado y al ser saprófito del suelo, usa un amplio rango de compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno.

Éste se desarrolla mejor con L-alanina, L-aspártico, ácido L-glutámico y ácido casamino como fuentes de nitrógeno. El desarrollo sobre NH_4^+ fue considerablemente superior que sobre NO_3^+ ; en tanto que algunos aislamientos de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma koningii* fueron incapaces de usar NO_3^+ . Las mejores fuentes de carbón fueron: dextrosa, fructosa, manosa, galactosa, xylosa, ribosa y celobiosa. Todos los aislamientos probados descomponen rápidamente la celulosa (Danielson y Davey, citados por Cabrera y Tejera, 2002).

2.3.5 Factores que afectan el desarrollo y la supervivencia de *Trichoderma*

2.3.5.1 Humedad

Dentro del género *Trichoderma*, las diferentes especies difieren en los requerimientos de los contenidos de humedad. Algunas especies están adaptadas a condiciones de excesiva humedad como es el caso de *Trichoderma hamatum* y *Trichoderma pseudokoningii*, mientras que otras necesitan niveles de humedad moderados en el suelo para un buen desarrollo. Por lo general, el crecimiento en el suelo se vio favorecido cuando no había situaciones extremas de excesos de humedad o cuando el suelo estaba demasiado seco (Danielson y Davey, citados por Cabrera y Tejera, 2002).

2.3.5.2 pH

Hay pocos estudios detallados del efecto del pH sobre el crecimiento del hongo en sus medios naturales, pero usualmente el crecimiento óptimo está dentro del rango 4 a 6.5 y solamente pocas especies toleran un pH menor a 3.

La respuesta de los conidios a los nutrientes es también afectada por el pH, siendo mayor la germinación bajo condiciones ácidas que neutras; mientras que la formación de los conidios parece no estar influenciada por cambios en el pH entre 2.2 y 7.6 (Danielson y Davey, citados por Cárdenas, 2003).

2.3.5.3 Temperatura

La influencia de la temperatura sobre el crecimiento parece ser un fenómeno adaptativo. Las especies originarias de climas cálidos tienen temperaturas óptimas mayores (Danielson y Davey, citados por Cárdenas, 2003).

En un trabajo realizado por Danielson y Davey, citados por Cabrera et al. (2002), se aislaron 16 cepas de diferentes especies, las cuales presentaron un rango de temperaturas máximas entre 28° a 42 °C, con un rango de temperaturas óptimas de 22° a 34 °C.

Una de las cepas aisladas de *Trichoderma harzianum*, registró un buen crecimiento aún a los 7 °C, tolerando una temperatura máxima para su desarrollo de 32 °C y mostrando una temperatura óptima de 27 °C.

2.3.6 Mecanismos de biocontrol de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* comprende un gran número de especies que actúan como agentes de control biológico, las propiedades antagonistas en las cuales se basan son la activación de múltiples mecanismos.

Las especies de *Trichoderma* ejercen biocontrol contra hongos fitopatógenos de manera indirecta compitiendo por nutrientes y espacio, promoviendo el crecimiento de las plantas o a través de mecanismos defensivos. También actúa directamente a través de mecanismos como micoparasitismo.

Estos mecanismos indirectos y directos pueden actuar en coordinación y su importancia en el proceso de biocontrol depende de la especie de *Trichoderma*, del hongo atacado, del cultivo hospedero y de las condiciones ambientales, incluyendo disponibilidad de nutrientes, pH, concentración de hierro en el suelo y temperatura.

La activación de cada mecanismo implica la producción de compuestos específicos y metabolitos como factores de crecimiento de las plantas, enzimas hidrolíticas y antibióticos (Benitez et al., 2004).

2.3.6.1 Inactivación de enzimas del patógeno

Enzimas de *Botrytis cinerea*, como quitinasas, glucanasas, pectinasas y cutinasas, fueron suprimidas por la acción de una secreción de proteasas de *T. harzianum* T39 en la superficie de las plantas (Elad et al., 1999).

2.3.6.2 Competencia

La competencia es un mecanismo indirecto, donde no hay acción directa del antagonista sobre el patógeno. En este caso ambos compiten imponiéndose uno de ellos por ser capaz de procurarse de manera mas rápida y eficiente los nutrientes y o el sitio necesario para desarrollarse. Este mecanismo hace referencia al desigual comportamiento de dos o mas microorganismos ante un mismo requerimiento, cuando la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para otros (Mondino y Vero, 2006).

Las especies de *Trichoderma* son consideradas competidores agresivos. *Trichoderma spp.* tiene un rápido crecimiento y alta velocidad para colonizar el sustrato. La competencia por la rizósfera de los agentes de biocontrol es importante, especialmente en tratamientos de semillas. Ésta es la zona crítica de protección contra patógenos. Es importante para el control de enfermedades de raíz, ya que un

biocontrolador no puede competir por espacio y nutrientes si no puede crecer en la rizósfera.

Las especies de *Trichoderma*, ya sean aplicadas al suelo o como tratamiento de semillas, acompañan rápidamente el desarrollo del sistema radicular de las plantas tratadas.

Tratamientos del suelo con esporas de *Trichoderma harzianum*, suprimen el desarrollo del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *F.oxysporum* f. sp. *meloni*.

La competencia es uno de los mecanismos utilizados, aunque no está comprobado que sea la actividad principal.

Marchetti et al., sugirieron la competencia a nivel de atmósfera como mecanismo de biocontrol. En experimentos in vitro, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, y *Chalara elegans*, fueron fuertemente inhibidos por *Trichoderma*, mientras que *Fusarium oxysporum* y *Cytospora* sp., mostraron resistencia a la actividad antagónica de cuatro especies de *Trichoderma* (Ozbay y Newman, 2004).

Trichoderma produce sustancias volátiles que inhiben el crecimiento de otros hongos. Estas sustancias son notorias cuando *Trichoderma* es sembrado en placas y al abrirlas se percibe olor a coco.²

2.3.6.3 Antibiosis

Trichoderma spp produce antibióticos volátiles y no volátiles.

Howell y Stipanovic (1983), aislaron y describieron un antibiótico, glovirin de *Gliocladium* (*Trichoderma*) *virens* que fue fuertemente inhibitorio de *Pythium ultimum* y *Phytophthora*. Sivan et al., citados por Ozbay y Newman (2004) reportaron que *Trichoderma* era antagonista de *Pythium aphanidermatum*, producía componentes inhibitorios.

Cuando se hacía crecer *Trichoderma* en una membrana de celofán sobre agar y luego se removía esta membrana y en este agar se inoculaba *Pythium*, se vio que el crecimiento del patógeno era parcialmente inhibido por sustancias producidas por *Trichoderma*.

Liftshitz et al., citados por Ozbay y Newman (2004), mostraron que el control de especies de *Pythium* en porotos por *Trichoderma harzianum* cepa T12 y *T. koningii* cepa T8, no era a causa de la competencia ni del micoparasitismo. Ellos explicaron el biocontrol por la producción de un factor tóxico por el organismo biocontrolador que inhibía el crecimiento de los patógenos. A pesar de esto, los intentos de correlacionar la antibiosis in vitro por *Trichoderma* sobre patógenos fúngicos con lo que realmente pasaba en sistemas naturales, no dieron resultado.

² Mondino P. 2007. Com. personal

En bibliografía sobre *Trichoderma* se ha encontrado que secreta un número de antibióticos y antifúngicos que incluyen: pironas, isocianatos, péptidos y trichotecenos. No está demostrado que estos metabolitos de acción antibiótica sean un factor de biocontrol bajo condiciones de campo por lo que son un punto de especulación (Ozbay y Newman, 2004).

2.3.6.4 Producción de enzimas

Las más recientes búsquedas que se han hecho para determinar los mecanismos de control han conducido a explicaciones alternativas de biocontrol.

Enzimas como quitinasas o glucanasas producidas por el agente biocontrolador son las responsables en suprimir al patógeno. Estas enzimas funcionan quebrando los polisacáridos, quitina y β -glucanos que son los responsables de la rigidez de las paredes celulares de los hongos y destruyendo la integridad de la pared celular.

Las hifas del biocontrolador penetran el tejido cortical y epidérmico de la raíz destruyendo las hifas del patógeno, con un pequeño o nulo daño en el tejido sano de la planta (Howell, 2003).

Se ha visto que *T. harzianum* presenta este mecanismo en el control de alguna de las enfermedades pero que no es el único, por lo tanto se podría decir que los mecanismos no actúan aisladamente sino que se combinan. Este hongo tiene la capacidad de producir proteasas que inactivan las enzimas hidrolíticas de *Botrytis cinerea*. Las proteasas rompen las enzimas hidrolíticas en las cadenas peptídicas y sus constituyentes –aminoácidos-, con lo cual destruyen la capacidad de actuar sobre las células de la planta.

El concepto de la biosíntesis de enzimas como un mecanismo de biocontrol se ha expandido hasta incluir el sinergismo entre la producción de enzimas y antibióticos. Esto quiere decir que el efecto de ambos procesos tiene buenos resultados en el control de enfermedades (Benitez et al., 2004).

2.3.6.5 Resistencia inducida

Cepas específicas de hongos del género *Trichoderma*, colonizan y penetran los tejidos radiculares de las plantas e inician una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que se considera que son parte de la respuesta de defensa de la misma. Esto lleva a una resistencia sistémica inducida en toda la planta.

Esto fue demostrado con aislamientos de *T. harzianum* T39. Células del agente de biocontrol aplicadas a raíces de plantas y células muertas aplicadas a las hojas de pepino indujeron control de moho polvoriento (mildiu).

Raíces de pepino inoculadas con T-203, mostraron mayor actividad de quitinasas, alfa β 1,3-glucanasas, celulasas y peroxidasas cuando fueron comparadas con el testigo sin tratamiento, 72 horas después de la inoculación (Yedidia et al., 1999).

2.3.6.6 Micoparasitismo

Trichoderma spp. son géneros activos como micoparásitos y por lo tanto pueden servir como un potencial agente de biocontrol.

Trichoderma crece hacia las hifas de otros hongos, enrollándolos y degradan las paredes celulares del hongo por la secreción de diferentes enzimas líticas.

El proceso de micoparasitismo limita el crecimiento y actividad de los hongos patógenos de las plantas. *Trichoderma* ataca las hifas de los hongos mediante el enrollamiento, con ganchos y apresorios como cuerpos y penetra la pared de las células hospederas secretando enzimas líticas. Es una interacción específica y no una simple respuesta al contacto. *Trichoderma* reconoce las señales del hongo hospedero.

Se conoce que *Trichoderma harzianum* produce una alta concentración de enzimas degradadoras de pared celular como alfa-1,3-glucanasas y diferentes enzimas quitinolíticas. Estas enzimas han sido sugeridas como la clave del micoparasitismo. Varias enzimas han sido purificadas, caracterizadas y su habilidad para inhibir la germinación de esporas y elongación de las hifas del patógeno fue demostrada in vitro (Corrêa et al., 2001).

Algunos resultados experimentales reportaron un rol potencial atribuido a quitinasas. Se piensa que éstas son enzimas clave en el micoparasitismo.

Trichoderma produce celulasas, alfa 1,3-glucanasas, quitinasas y degrada los glucanos en la pared de *Pythium spp.* y la quitina y glucanos en la pared de *Rhizoctonia solani* (Ozbay y Newman, 2004).

Las hifas de *Trichoderma* enrollan y penetran las hifas del patógeno diluyendo el contenido citoplasmático.

2.3.7 Biopromoción de crecimiento por *Trichoderma harzianum*

El género *Trichoderma* aparte de controlar enfermedades producidas por diferentes patógenos, tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas inoculadas con el mismo.

Howell (2003) ha mostrado que plantas tratadas con una cepa de *T. harzianum* han sido mas eficientes en la utilización del nitrógeno del suelo, debido a que existe una fuerte interacción entre una bacteria fijadora del nitrógeno (*Bradyrhizobium japonicum*)

y *Trichoderma harzianum*. Teóricamente la combinación bacteria-hongo permite una eficiencia mayor en el uso de nitrógeno por la planta.

Estudios posteriores confirman que plantas inoculadas con *Trichoderma* presentan un mayor desarrollo de las raíces aumentando significativamente el peso seco radicular y aéreo, mayor área foliar que plantas control (sin *Trichoderma*). También se ve un aumento en los niveles de algunos nutrientes en raíz y tallo como ser Cu, P, Fe, Zn, Mn y Na. Los autores consideran el aumento de la nutrición en la planta está directamente relacionada con el beneficio general del efecto en el crecimiento sobre el sistema radicular con *Trichoderma harzianum*.

2.3.8 Protección de semillas contra el ataque de hongos patógenos

Trichoderma coloniza las semillas botánicas protegiendo las futuras plántulas en la fase post-emergente de patógenos fúngicos, garantizando la próxima cosecha. Así las semillas reciben una cobertura protectora cuyo efecto se muestra cuando la misma es plantada en el sustrato correspondiente.

Las semillas agrícolas, tratadas con *Trichoderma* protegen eficientemente las plántulas en el semillero sin necesidad de tratamiento del suelo previo a la siembra.

El empleo de *Trichoderma* por medio de las semillas es probablemente la forma más económica y extensiva para introducir el biocontrol en la producción, el método sencillamente consiste en tratar las semillas con una suspensión acuosa de esporas o en forma de polvo, con o sin necesidad de adherente.

2.3.9 Efectos adversos de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol

El uso de este agente puede tener un efecto adverso en el proceso de micorrización, debido a que suprime la colonización de las raíces por los hongos micorrícicos (Smith y Read, 1997).

2.3.10 Caracterización de la principales enfermedades controladas por *Trichoderma harzianum*

En este capítulo se hace énfasis en la caracterización de dos enfermedades: Damping-off y Moho gris, ya que son las que aparecen mas frecuentemente en los viveros donde existe producción de coníferas como lo es *Pinus taeda*.

2.3.10.1 Damping off

Esta enfermedad se conoce con el nombre común de “Enfermedad de los almácigos”, “Podredumbre de cuello” o “Mal de los semilleros”.

Los agentes causales de este mal son un grupo de varias especies: *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Sclerotium spp.*, etc. (Romero, 2004).

Se trata de una enfermedad cosmopolita caracterizada por provocar daños de alto nivel de manera rápida como ser:

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

Las características ambientales como ser humedad y temperatura hacen variar la presencia o ausencia de los diferentes patógenos del damping off, ya que todos tienen rangos de sobrevivencia distintos.

2.3.10.2 Moho gris

Es una enfermedad producida por el patógeno *Botrytis cinerea* pers ex Fr. (Romero, citado por Añón et al., 2004) que ha cobrado mucha importancia en los viveros forestales, ya que, su presencia provoca el vuelco de ápices que aparecen cubiertos de moho gris y posteriormente ocurre la muerte de la planta.

El patógeno *Botrytis cinerea* produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Otro factor de estrés ambiental predisponente al ataque de *Botrytis* es la baja intensidad lumínica, ya que provoca un debilitamiento de la planta y posterior colonización del

patógeno. Así como también es favorecida por clima húmedo y temperaturas medias (18 a 23° C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germinen sus esporas y producir la infección.

Botrytis inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las mismas si están contaminadas o sobre restos de plantas a los que ha infectado (Agrios, 1996).

En la página a continuación se presenta el cuadro No. 2 en el cual se muestran las diferentes especies de hongos fitopatógenos controlados por *Trichoderma*.

Cuadro 2: Diferentes especies de hongos fitopatógenos controlados por el *Trichoderma*

Fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i>	Enfermedad	Cultivo
<i>Armillaria spp</i>	Pudrición de raíces.	Frutales
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Papa, tomate, frijol, fresa, flores, tomate.
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición	Maíz
<i>Phytophthora infestans</i>	Gota	Papa, pepino de agua
<i>Phytophthora spp</i>	Pudrición	Tabaco, flores, frutales, etc.
<i>Pythium spp</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Varios cultivos.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitamientos vasculares	Papa, tomate, frijol, plátano, maíz, clavel.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Zanahoria, tomate, lechuga, col, café, papa, cebolla, ajo, pimentón.
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Carbón de las raíces.	Maíz, frijol, melón, ajonjolí.
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Habichuela, tomate, lechuga, col, café, papa, cebolla, ajo, pimentón.
<i>Rosellinia necatrix</i>	Pudrición blanca de raíces	Aguacate, manzano
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Papa, tomate, frijol, fresa, flores, tomate.
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	Volcamiento	Pino

Fuente: adaptado de Herrera-Estrella y Carsolio (1998).

2.4 PEROXIDASAS

Al igual que los animales, las plantas están expuestas a patógenos de diversa naturaleza que pueden causarles enfermedad, e incluso la muerte. Y al igual que los otros organismos, las plantas poseen mecanismos para defenderse de ellos.

También se sabe que la inducción localizada de muerte celular, en el lugar de infección de la planta hospedadora, está acompañada por una activación transcripcional de genes de defensa que codifican la síntesis de metabolitos antimicrobianos y proteínas. Estas reacciones han sido confirmadas al demostrarse que no sólo los patógenos atenuados son capaces de inducir reacciones de resistencia en las plantas, sino también los microorganismos saprófitos agentes de biocontrol, entre ellos los pertenecientes al género *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Ezziyyani et al., citados por Ezziyyani et al., 2005).

Las defensas preformadas de las plantas se clasifican en bioquímicas y mecánicas. Dentro de las reacciones bioquímicas está involucrada la activación de proteínas relacionadas a la patogénesis (*proteínas PR*, *pathogenesis-related*). Éstas son sintetizadas por la planta en respuesta a condiciones de estrés y al ataque del patógeno, acumulándose rápidamente luego del reconocimiento. Algunas PR son quitinasas o glucanasas, enzimas capaces de degradar a los polisacáridos que constituyen la pared celular de muchos hongos, reduciendo su crecimiento. Otro ejemplo de proteínas PR son las peroxidasas que degradan peróxidos y las lipooxigenasas, enzimas que generan moléculas que extienden a toda la planta el estado de “alerta”.

En el caso de las peroxidasas, se trata de una respuesta bioquímica, y las características de la misma son las siguientes:

- Involucran tres grandes grupos de compuestos: péptidos y proteínas; metabolitos secundarios, e inhibidores de proteasas.
- La mayoría de las plantas sanas poseen metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Tales compuestos pueden estar presentes en su forma activa, o estar almacenados como precursores inactivos que son convertidos en las formas biológicamente activas por enzimas de la planta, en respuesta al ataque de patógenos o al daño de los tejidos.
- En general, estos compuestos inhibidores preformados se encuentran almacenados en vacuolas u otros organelos de las capas celulares externas de la planta (Buchanan et al., 2000).
- Las peroxidasas dentro de la célula vegetal se encuentran dentro de organelos específicos llamados peroxisomas, que a su vez se alojan dentro de los cloroplastos (Fleischer y Packer, 1974).

La respuesta de la planta implica modificar el metabolismo de las células vegetales involucradas en la reacción de defensa. Esto incluye la activación de genes involucrados en funciones de defensa, la apertura de canales para el intercambio de iones, la modificación de proteínas y la activación de enzimas preexistentes.

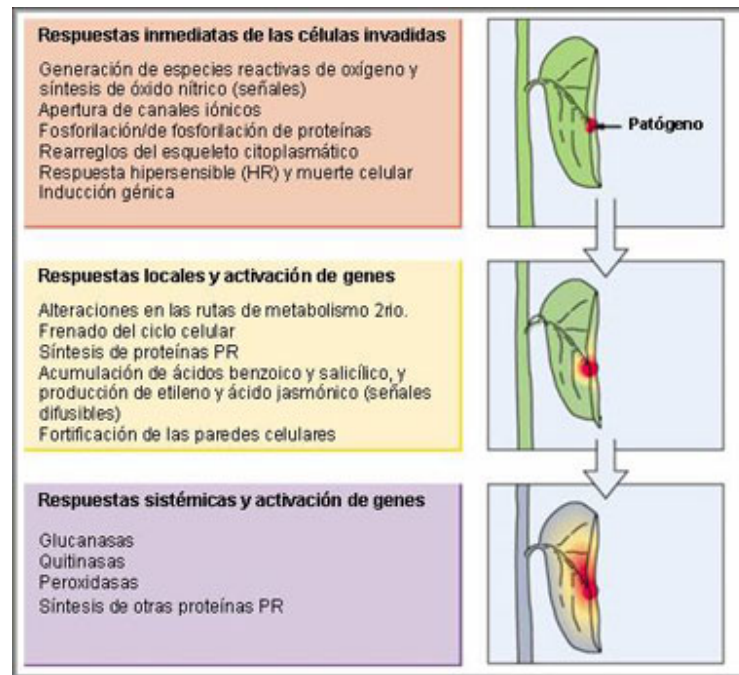


Figura 2: Representación esquemática del orden temporal de activación de las defensas de la planta, localmente y sistémicamente (en toda la planta), desde el sitio inicial de invasión por el patógeno (adaptado de Buchanan et al., 2000).

Esta inducción de las respuestas defensivas de la planta en forma rápida y altamente localizada resulta en la generación de un ambiente de condiciones desfavorables para el crecimiento y reproducción del patógeno. Al mismo tiempo, las células vegetales eliminan y dificultan la dispersión de toxinas generadas por el patógeno. Estas respuestas inician una respuesta sistémica de más larga duración denominada *Resistencia Sistémica Adquirida* que previene a la planta contra ataques futuros del mismo u otros patógenos.

Dado que estas respuestas requieren una gran inversión de componentes celulares, las defensas se mantienen bajo un ajustado control genético y sólo se activan frente a la presencia del patógeno (Levitus, 2003).

Las peroxidasas son un tipo de enzimas muy extendidas en toda la escala filogenética.

Catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando el peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido.

Prácticamente todas las peroxidasas son hemoproteínas (excepción notable es la glutatión peroxidasa, que es una selenoproteína) y tienen como sustrato común el H_2O_2 (peróxido de hidrógeno).

Se encuentran localizadas en: animales, plantas, hongos y organismos procariotas. Las peroxidasas de plantas se caracterizan por ser glicoproteínas monoméricas que contienen dos iones calcio y 4 puentes disulfuro. Como enzima más representativa y estudiada se encuentra la peroxidasa de raíz de rábano conocida por sus siglas en inglés como HRP. Se trata de una enzima de secreción, que interviene en diversos procesos: formación de radicales libres (síntesis de pared celular); oxidación de metabolitos secundarios (reacción de defensa); regulación del crecimiento y diferenciación celular. Las peroxidasas tienen un gran interés medio ambiental y biotecnológico. Son utilizadas para el tratamiento de residuos industriales y agrarios; en las industrias papeleras para el blanqueamiento de la pulpa de celulosa; en la obtención de plantas transgénicas; en el control de plagas mediante la síntesis de insecticidas no perjudiciales para el medio ambiente (Hernández, 1998).

La superfamilia de peroxidasas en las plantas se divide en 3 clases, basado en las diferencias de estructura primaria:

- Clase 1: incluyen enzimas intracelulares en plantas, bacterias y algunos tipos de hongos, como citocromo c peroxidasa microbiana (EC1.11.1.5), catalasa peroxidasa bacteriana (EC 1.11.1.6) y ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11).
- Clase 2: peroxidasas extracelulares de hongos incluyendo ligno-peroxidasas (EC 1.11.1.14) y Mn^{2+} peroxidasa independiente (EC 1.11.1.13).
- Clase 3: las peroxidasas de plantas (EC 1.11.1.7) fueron descriptas originalmente como peroxidasas y son secretadas fuera de las células o transportadas dentro de las vacuolas. Son ampliamente encontradas en animales, plantas y microbios y oxidan un vasto rango de componentes (donadores de electrones) en la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
A esta clase pertenecen las peroxidasas estudiadas en este ensayo.

Varias funciones fisiológicas para las peroxidasas de la clase 3 han sido sugeridas, por ejemplo:

- remoción de H_2O_2
- oxidación de reductores tóxicos
- biosíntesis y degradación de lignina
- respuesta de defensa ante heridas
- catabolismo de auxinas

Tienen un amplio rango de especificidad de sustrato y existe una multitud de formas de isoenzimas, haciendo difícil saber cual es la función precisa (Kawaoka et al., 2003).

En cuanto a la respuesta de defensa ante heridas, ésta ha sido explicada por las peroxidasas por su rol catalítico en el entrecruzamiento de pectinas y proteínas estructurales de las paredes celulares o por la polimerización de monómeros fenólicos de la lignina y suberina, en un ensayo realizado por Benitez et al. (2004).

2.5 TRICHOSOIL ®

Trichosoil es un fungicida biológico a base de una cepa de *Trichoderma harzianum*, cepa L1 aislada por Lage y Cía. S.A. en el Departamento de Canelones a partir de un escleroto de *Sclerotium rolfsii* en un cultivo de ajo.

Trichosoil se compone de: *Trichoderma harzianum* cepa L1 (mínimo 5×10^8 ufc/g de producto) en un 58,8 % y de materia inerte en un 41,2 %.

Formulado en un soporte sólido de fácil aplicación, que se incorpora a sustratos para la producción de plantines o en suspensión acuosa como riego en el transplante o al cuello de plantines o plantas de cultivos forestales, hortícolas y ornamentales.

También puede ser aplicado en canteros con suelo desinfectado, ya sea solarizado o con desinfectante de suelos, o en suelos sin desinfectar con una mayor dosificación.

Ha sido especialmente desarrollado para el control de hongos patógenos del género *Sclerotium spp*, *Sclerotinia spp*, *Botrytis spp*, *Fusarium spp* y los pertenecientes al complejo damping-off.

En condiciones de invernáculo y de campo, Trichosoil detiene el desarrollo del micelio del patógeno y de las estructuras de resistencia, como los esclerotos. A éstos últimos no acceden los productos químicos y permanecen en el suelo como fuente de inóculo potencial para sucesivos cultivos.

Tiene un espectro definido de tolerancia a fungicidas como flutolanil, ipriodone, metalaxil, propamocarb, folpet, entre otros, y se han constatado incrementos en el porcentaje de plantas sanas y reducción de la incidencia y severidad del patógeno

(*Sclerotium spp* y *Sclerotinia spp*) cuando se aplica Trichosoil con los fungicidas citados.

También es posible alternarlo con fungicidas en un plan de Manejo Integrado de enfermedades como las causadas por *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia spp* o *Fusarium spp*; tomando la decisión de aplicar uno u otro producto según el ciclo en que se encuentre el patógeno y las condiciones ambientales.

Debe tenerse en cuenta que Trichosoil no ejerce acción inmediata de control y es necesario un tiempo luego de su aplicación para que colonice el sustrato o superficie vegetal, lo cual depende entre otras cosas, de las condiciones de temperatura y humedad (Añón et al., 2004).

La producción de agentes microbianos como en este caso Trichosoil, se obtiene cumpliendo las siguientes etapas:

- 1)- La selección de cepas que requiere la definición de todos aquellos parámetros de eficiencia, competitividad y persistencia en el sistema que permitan comparar el mayor número posible de individuos aislados y también cepas seleccionadas liberadas o de colecciones extranjeras, que mantengan estabilidad genética frente a la manipulación y sucesivos cultivos sin sufrir alteraciones de su genoma.
 - 2)- Aptitud para el cultivo en medios comerciales, para verificar la habilidad y capacidad de producir biomasa en contenedores industriales con ingredientes económicos y disponibles en el país o de fácil acceso.
 - 3)- Selección del soporte para la vehiculización del agente microbiano, teniendo en cuenta:
 - la necesidad de esterilización del mismo por el método mas conveniente y económico
 - la disponibilidad y facilidades para su manipuleo
 - la capacidad de sostener altas poblaciones microbianas en almacenamiento por períodos no menores a 6 meses.
 - 4)- Formulación del producto comercial, etapa que comprende todo lo referente al comportamiento del principio activo (el o los agentes microbianos seleccionados) en el vehículo y la compatibilidad con los adyuvantes.
 - 5)- Envase y envasado requieren definición de las características en función del mercado, infraestructura para el envasado y condiciones de almacenamiento en planta y en el mercado.
- Un producto comercial a base de un agente microbiano deberá mantener eficacia similar al potencial de la cepa incluida, estabilidad física y biológica en almacenamiento, bajo costo para el productor (usuario final), practicidad en la aplicación, buena cobertura del

follaje, tolerancia a condiciones ambientales adversas, compatibilidad con aquellos agroquímicos más empleados, entre otros parámetros cualitativos.

Deberá tener una concentración que iguale o supere los estándares preestablecidos para los cultivos líquidos, el producto salido de planta industrial y el producto almacenado.

En conclusión, la calidad final del producto se define a través de la concentración mínima exigida para el producto salido de fábrica, la concentración mínima requerida a la fecha de vencimiento, pureza, viabilidad, estabilidad e identidad genética del organismo, entre otros parámetros que deben ser establecidos para cada agente microbiano (adaptado de Mondino y Vero, 2006).

2.6 USO DE CORTEZA DE PINO COMO COMPONENTE DEL SUSTRATO UTILIZADO

Debido a que el hongo *Trichoderma* fue sembrado en el sustrato y el mismo se compone de 60% de corteza de pino compostada, se dará a ésta una descripción detallada de sus características, ya que se considera un factor importante para el desarrollo del hongo y de la planta misma.

A continuación se hace énfasis en la preparación y compostaje de la corteza de pino.

2.6.1 Componentes de la corteza

Se considera corteza a todo material sobre el exterior del último anillo del xilema secundario (Maggs, 1987). Se puede hacer una diferencia entre corteza interna, la cual incluye el cambium vascular y la porción viva del floema conductor, y corteza externa la cual consiste en la peridermis y los tejidos aislados por esta formación (Zimmerman y Brown, 1974).

La corteza como medio de desarrollo para la planta se compone de los siguientes componentes en proporciones variables:

- materia orgánica y organismos vivos
- fracción inorgánica con partículas minerales
- agua
- aire

La materia orgánica es la fracción base en la cual la planta ancla y tiene un óptimo crecimiento radicular. Un buen medio de crecimiento suministra a las raíces agua, aire y elementos nutritivos en proporciones balanceadas. Estos factores anteriormente nombrados son influenciados por las propiedades físicas, químicas y biológicas del medio.

2.6.2 Composición química de la corteza

La composición química de la corteza de pino es importante conocerla cuando se prepara como medio de crecimiento.

La corteza de *Pinus taeda* contiene: extractivos neutros solubles (17,3%), extractivos álcali-solubles (20.8%), lignina después de extracción álcali (20.4), holocelulosa (41.7%) y cenizas (0.7).

Los compuestos solubles con extractivos neutros son los que presentan mayor importancia debido a que son los responsables de las propiedades fitotóxicas de la corteza.

2.6.2.1 Constituyentes orgánicos

- Taninos

Son los que dan a la corteza el olor característico y no permiten el desarrollo de semillas debido a que son tóxicos y reducen el crecimiento radicular. Esto sucede en corteza que no ha sido compostada aún.

Afortunadamente los taninos son solubles en agua, por lo que, luego de ser molida la corteza y pasado cierta cantidad de semanas, su cantidad se reduce a niveles que dejan de ser tóxicos para las plantas. Además los taninos son desnaturalizados por calor y por el proceso de compostaje, el rango de temperatura de la pila de corteza a compostar ayuda a reducir los niveles de estos compuestos.

- Celulosa

Es el polisacárido de la corteza, forma parte del grupo de la holocelulosa. Su porcentaje difiere según las especies y edades, teniendo los árboles jóvenes una mayor cantidad.

Durante el compostaje la celulosa es la fracción que es más rápidamente atacada por los microorganismos y su contenido determina los requerimientos de nitrógeno durante el proceso de compostaje. En general la corteza de pino tiene bajas cantidades de celulosa en comparación a los *Eucalyptus*, requiriendo mayor agregado de nitrógeno para compostaje de corteza de pino que para la de *Eucalyptus*.

- Lignina

Muchas cortezas tienen levemente una mayor cantidad de lignina que celulosa. Esta lignina es resistente a la degradación enzimática y en períodos largos de tiempo se observa una mínima disminución de la misma. A causa del alto contenido de lignina en

la corteza se forma un medio de crecimiento estable que no pierde su estructura ni sus propiedades físicas como ocurre en el proceso de descomposición.

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 Colonvade S.A., en el período correspondiente al 4 de diciembre de 2006 hasta el 30 de junio del 2007.

3.2 INVERNÁCULO

El invernáculo donde se realizó el ensayo tiene una superficie aproximada de 600m² (10m x 60m); los caminos internos son de hormigón y las bandejas están colocadas en rieles de chapa, los cuales a su vez se sostienen en un soporte de madera. Debajo de estos soportes la superficie del suelo está cubierta de piedras pequeñas que evitan el crecimiento de malezas, en donde pueden convivir ciertos patógenos y pequeños animales que perjudican a las plantas y a los operarios del vivero.

Las bandejas sobre los rieles se encuentran apoyadas a una altura de aproximadamente 1m, lo que ayuda a un mejor manipuleo y traslado de las mismas.

La estructura del invernáculo se compone de caños galvanizados cubiertos por polietileno transparente con filtro para rayos ultravioletas y malla sombrite. Hay dos tipos de mallas sombrite: una lateral que intercepta el 80 % de la luz solar y una superior que intercepta el 20 %. A su vez, la misma malla también brinda protección contra pájaros, que se comen las semillas recién sembradas.



Figura 3: Foto del interior del invernáculo

3.3 SUSTRATO

El sustrato utilizado en este ensayo se compone de 60 % de corteza de pino compostada proveniente de Corrientes (Argentina) y 40 % de turba. Las propiedades del mismo son las siguientes:

- pH: 4,8-5.5
- Conductividad eléctrica: 800-1000 micro Siemens
- Densidad: 380-450 g/Kg (varía con la humedad y tamaño de partículas)

A dicho sustrato se le incorporó Superfosfato de Ca en una dosis de 4kg/m³, en aquellos tratamientos en los cuales la aplicación de fertilización starter ya se había determinado.

3.4 TRICHOSOIL

Se agregó este biofungicida en diferentes cantidades según los tratamientos planteados y se hicieron diferentes montículos de sustrato.

Se utilizaron 3 dosis de Trichosoil 0, 330 y 660grs lo que equivale a 0, 3 y 6 kg/m³ de sustrato respectivamente.

El producto (Trichosoil) se incorporó al sustrato el 21 de noviembre del 2006 y se cubrió con nylon, para incubar y promover la germinación de los conidios y el desarrollo de más micelio de *Trichoderma harzianum* cepa L1.

3.5 BANDEJAS

Las bandejas utilizadas son de PVC negro, de 72 celdas cada una con un volumen por celda de 93cm³.

La forma de las celdas es de pirámide truncada e invertida y poseen bordes rectos y costillas para evitar la espiralización de raíces.

Las bandejas presentan pequeños espacios huecos entre las celdas con el objetivo de mejorar la densidad y distribución de los plantines.

3.6 SEMILLAS

Las semillas de *Pinus taeda* utilizadas en el ensayo fueron importadas de Pelham, Alabama (Estados Unidos). Éstas fueron tratadas en el país de origen con CAPTAN 0,8 kg/kg de semilla y THIRAM 8,5 g/kg de semilla, como tratamiento fungicida.

En uno de los tratamientos ensayados, la semilla utilizada no fue tratada previamente con fungicidas.

Las semillas previo a la siembra se conservaron en heladera a 4°C.

3.7 SIEMBRA

Se llenaron las bandejas el 4 de diciembre de 2006, identificando cada una según el sustrato.

La siembra se realizó con una sembradora neumática, la cual colocaba dos semillas por celda. Luego se cubrieron las bandejas sembradas con vermiculita.

3.8 RIEGO

El sistema utilizado es por aspersión, lo que asegura alta uniformidad, una mejor penetración del agua en profundidad y un menor riesgo de pérdida de semillas y lavado de sustrato.

Este método de aplicación consta de un carro móvil con barra hacia los dos lados equipada con boquillas adaptables según etapa de crecimiento y aplicación de fertilizante. Las boquillas comúnmente utilizadas son planas con un caudal de 9mm/hora para riego.

La frecuencia e intensidad del riego van variando según los requerimientos de las plantas en desarrollo y la época del año.



Figura 4: Carro móvil que realiza el riego por aspersión

El sistema de riego se compone por los siguientes elementos:

- 4 pozos semisurgentes que generan un caudal de 14 metros cúbicos por hora.
- Tanques Australianos con capacidad para 450 metros cúbicos.
- Tajamar de reserva con capacidad para 25.000 metros cúbicos.
- Alas con aspersores sobre un carril autoportante.

La calidad del agua de riego, es muy buena debido a la zona en la que se encuentra ubicado el vivero, donde aflora el Acuífero Guaraní. Dicha agua no presenta problemas de dureza, ni presencia de materia orgánica o alta salinidad.

3.9 FERTILIZACIÓN

Cuadro 3: El siguiente cuadro muestra el programa de fertilización aplicado:

Etapas	Fecha	Fertilizante a usar	Dosis por plantín grs. (celda)	Dosis por bandeja grs.	Dosis de los bloques (30 bandejas)grs.
Starter		SuperP de Ca	0.558	40.176	1205.28
Arranque	02/02/07 al 16/02/07	NPK (2:3:2) Fosfato de amonio 18:44	0.175	12.6	378
Cría	13/03/07 al 22/03/07	NPK (3:2:2), Fosfato de amonio + No ₃ NH ₄	0.056	4.032	120.96
Terminación	28/03/07 al 04/04/07	NPK (2:3:5)	0.056	4.032	120.96

La fertilización fue aplicada junto con el riego, en tres etapas que fueron detalladas en el cuadro anterior.

La fase de arranque, se llevó a cabo en 2 semanas y la de cría y terminación en 1 semana cada una. Las dosis de fertilizante son las aplicadas por tratamiento en el total del ciclo.

En un principio se pretendió seguir el programa de fertilización utilizado por la empresa Colonvade S.A., pero debido al rápido crecimiento de las plantas se decidió disminuir las aplicaciones.

Programa de fertilización utilizado por Colonvade S.A.:

Semana	1-2-3-4-5-6	7-8-9-10	11-12-13-14-15-16	17-18-19
Etapas de fertilización	Starter	Arranque	Cría	Terminación

3.10 TRATAMIENTOS

En el siguiente cuadro se presentan los tratamientos planteados en el ensayo, en el cual se prueban diferentes dosis de Trichosoil y aplicación o no de fertilización starter.

Cuadro 4: Tratamientos planteados en el ensayo:

T0	Con fertilización starter (Superfosfato de Ca) Sin Trichosoil	20 b. sembradas
T1	Con fertilización starter + 330grs de Trichosoil	35 b. sembradas
T2	Sin fertilización starter + 330grs de Trichosoil	36 b. sembradas
T3	Con fertilización starter + 660grs de Trichosoil	36 b. sembradas
T4	Sin fertilización starter + 660grs de Trichosoil	38 b. sembradas
T5	Ídem T0/Sin semilla curada	20 b. sembradas

Se realizaron 6 tratamientos en los cuales se varió la dosis de Trichosoil, y la aplicación o no de fertilización starter. El tratamiento 5 se probó para ver si hay diferencia, al utilizar semilla no curada, frente al T0 que es igual pero con semilla curada.

Se tomó el tratamiento 0 como testigo, el cual siguió el programa de fertilización comúnmente aplicado por la empresa.

3.11 DISEÑO ESTADÍSTICO

El diseño estadístico utilizado fue de bloques completos al azar, en donde se hicieron 5 bloques con los 6 tratamientos cada uno. La unidad experimental son las bandejas que poseen una capacidad de 72 plantines.



Figura 5: Diseño del ensayo con los diferentes bloques

3.11.1 Muestreo

3.11.1.1 Sustrato

Se realizó un análisis de sobrevivencia de *Trichoderma harzianum*. Las muestras se tomaron el 28 de marzo y posteriormente se llevaron al Laboratorio Lage y cía. S.A. en donde se realizó el análisis.

3.11.1.2 Plantines

Parámetros morfológicos

- altura y diámetro de cuello

Los plantines medidos por bandeja se seleccionaron por sorteo. Se realizaron dichas medidas el 13, 28 de marzo y 20 de abril.

Parámetros fisiológicos

- análisis foliar: Nitrógeno, Potasio, Fósforo y Boro

Se realizó un primer muestreo el 28 de marzo y un segundo muestreo el 04 de abril, coincidiendo con la segunda y tercer etapa de fertilización.

- peso fresco y peso seco de parte aérea y radicular

Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Suelos y Aguas de Facultad de Agronomía.

Para mantener los plantines en buen estado, se colocaron en bolsas de polietileno tratando de que la parte radicular permaneciera adherida al sustrato húmedo y la parte aérea en contacto con la atmósfera. Se mantuvieron en heladera hasta la realización del procedimiento.

3.12 MEDIDAS REALIZADAS

3.12.1 En sustrato

Se tomaron muestras de sustrato de los diferentes tratamientos y se almacenó en heladera hasta el momento de realizar el análisis en el laboratorio de Lage y cía. S.A.

El procedimiento utilizado –Recuento de viables por método de dilución en placa-, para el conteo de colonias fue explicado por la Ing. Agr. Claudine Folch, quien fue la encargada de efectuarlo en el laboratorio y 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:
 - Sacarosa 10 g/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 rojo congo 10 ml
- 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 recuento promedio de las placas se multiplica por la dilución que le corresponde. Los datos se expresan en UFC por gramo de sustrato.

3.12.2 Plantines

3.12.2.1 Análisis foliar

Se realizó en el laboratorio de la Ing. Agr. Alicia Crossara. Para el mismo se tomaron 5 plantines de cada tratamiento, a excepción de los tratamientos 2 y 4, de los cuales se tomaron 16 plantines debido a su reducido tamaño.

3.12.2.2 Mediciones morfológicas

Se midieron los parámetros altura y diámetro de cuello, en los mismos plantines que formaron los bloques. A dichos plantines se los midió en 3 momentos: 13, 28 de marzo y 20 de abril, coincidiendo las fechas con la terminación de cada fase de la fertilización.

Se utilizaron como instrumentos de medida regla milimetrada para altura y calibre para diámetro de cuello (Anexos Tabla 1).

3.12.2.3 Mediciones fisiológicas

Se sortearon las celdas de las cuales se sacaron los plantines que formaron las muestras, éstas estaban formadas por 5 plantines por tratamiento por bloque.

Se realizaron las mediciones el 14 de marzo y el 24 de abril de 2007. (Anexos Tabla 2)

El procedimiento que se realizó fue el siguiente: las muestras de la heladera se lavaron con agua destilada, se separó parte aérea y radicular de los plantines que formaron la muestra y se secaron con papel absorbente, luego se prosiguió a pesar en balanza de alta precisión para obtener peso fresco de la parte aérea y radicular.

Para realizar peso seco se siguió un procedimiento de INIA, que se basa en el secado de la muestra en el microondas, variando los tiempos según el tamaño de la misma. Las muestras se colocan en bolsas de papel junto a un vaso de Bohemia con agua y van al microondas por un lapso de 4 a 5 minutos. El vaso de Bohemia permite que la muestra no se incinere (Cozzolino, 1994).

3.12.3 Análisis de la actividad de las peroxidasas

Este análisis se realizó en la Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química por Laura Franco.

La actividad fue expresada en unidades de enzima (UE) definida como "la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 microl de producto (o-dianisidina oxidada) por minuto en las condiciones ensayadas (Temperatura ambiente, pH 4.8).

El resultado está expresado de dos maneras:

- 1) UE totales por gramo de material fresco utilizado.
- 2) UE totales por miligramos de proteínas solubles extraídas. La concentración de proteínas solubles se realizó por método de Biuret.

La reacción o prueba de Biuret es un método que detecta la presencia de compuestos con dos o más enlaces peptídicos y, por tanto, sirve para todas las proteínas y péptidos cortos.

La reacción xantoproteica es un método que se puede utilizar para determinar la cantidad de proteína soluble en una solución. El reactivo del biuret (sulfato de cobre en una base fuerte) reacciona con los enlaces del péptido y cambia el color cuando entra en contacto con otra sustancia. El espectrofotómetro se puede entonces utilizar para medir la intensidad del color que se produjo. Mientras más cantidad de proteína esté presente en la solución, más oscuro es el color.

Este test específico es para reconocer enlaces peptídicos, por lo tanto requiere de la presencia de al menos un tetrapéptido para que de positivo. Los reactivos utilizados son NaOH y $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Opera a través del ion Cu^{2+} el que en reacción alcalina interacciona con los iones de N^{-3} de los grupos amino formando un complejo color violeta.

3.13 OTRAS CONSIDERACIONES

Cabe destacar que durante el ciclo del ensayo no se presentaron enfermedades, por lo tanto no fue necesario la aplicación de fungicidas, lo que podría haber disminuido la cantidad de *Trichoderma harzianum* en el sustrato.

Hacia el final del ensayo se presentó un ataque de hormigas, lo que no permitió la medición de altura de algunos plantines de la muestra, pero este hecho no se consideró de gran relevancia.

3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los efectos del análisis estadístico, los 6 tratamientos se agruparon en 3 grupos: el primero fue solo el testigo con curasemilla (tratamiento 0), el segundo el testigo sin curasemilla (tratamiento 5), y el tercero los tratamientos en que se combinaba las dosis 330 y 660grs de Trichosoil, con y sin fertilización starter en un factorial completo (tratamientos de 1 a 4)

Las variables analizadas fueron: Pesos frescos y secos de parte aérea y radicular, altura y diámetro.

Se ajustó un modelo lineal general de medidas repetidas en el tiempo. La forma general del mismo fue la siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \lambda_j(\tau_i) + \phi_k(\tau_i) + (\lambda\phi)_{jk}(\tau_i) + \beta_l + \eta_m + (\eta\lambda)_{jm}(\tau_i) + (\eta\phi)_{km}(\tau_i) + (\eta\lambda\phi)_{jkm}(\tau_i) + \epsilon_{ijkl} + \epsilon_{ijklm}$$

Donde:

- Y_{ijkl} es la variable de respuesta (altura y diámetro)
- μ es la media general
- τ_i es el efecto del i-ésimo grupo de tratamientos
- $\lambda_j(\tau_i)$ es el efecto de la j-ésima dosis dentro del grupo de tratamientos
- $\phi_k(\tau_i)$ es el efecto de la k-ésima aplicación de starter dentro del grupo de tratamientos
- $(\lambda\phi)_{jk}(\tau_i)$ es la interacción entre dosis y starter dentro del grupo de tratamientos
- β_l es el efecto aleatorio de k-ésimo bloque
- ϵ_{ijkl} es el error experimental
- η_l es el efecto del l-ésimo muestreo
- $(\eta\lambda)_{jm}(\tau_i)$, $(\eta\phi)_{km}(\tau_i)$, $(\eta\lambda\phi)_{jkm}(\tau_i)$ son las interacciones con muestreo
- ϵ_{ijklm} es el error de las medidas repetidas

La autocorrelación de las medidas repetidas se modeló con estructura autorregresiva de orden 1. Se usó el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS versión 9.03. Las medias de los efectos que resultaron significativos, fueron comparados usando el test de Tukey.

A los efectos de estudiar la relación entre las medias de todas las variables estudiadas, se calcularon coeficientes de correlación de Pearson con los promedios generales de los pesos, alturas y diámetros, y los resultados de peroxidasas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A modo de facilitar la visualización de los tratamientos para su posterior análisis se presenta la siguiente tabla:

T0	Con fertilización starter (Superfosfato de Ca) Sin Trichosoil
T1	Con fertilización starter + 330grs de Trichosoil
T2	Sin fertilización starter + 330grs de Trichosoil
T3	Con fertilización starter + 660grs de Trichosoil
T4	Sin fertilización starter + 660grs de Trichosoil
T5	Ídem T0/Sin semilla curada

4.1 VARIABLE ALTURA

En el análisis de varianza realizado por el paquete estadístico SAS se observó que hay diferencias significativas entre los tratamientos, dosis y fechas para la variable altura, utilizando una probabilidad de 0.05 (Anexos Cuadro 1). La variable altura no fue afectada por los demás parámetros como lo es la dosis de Trichosoil.

En el análisis estadístico de esta variable, se observó un efecto de la aplicación de Trichosoil ($P < 0.0001$) que no fue el esperado (Anexos cuadro 2), y un efecto de la aplicación de fertilización starter ($P < 0.0001$), no detectándose un efecto de la dosis de Trichosoil. No se encontró interacción con la fecha de muestreo, concluyéndose que el efecto se mantuvo en el tiempo.

Las dosis de Trichosoil, la aplicación o no de fertilización starter y fecha, tuvieron un efecto diferente en la variable altura.

Debido a que hubieron diferencias significativas en el análisis de varianza, se realizó la Prueba Tukey, en donde se agruparon los tratamientos en 3 grupos: 0, 1234 y 5.

Los grupos 0 y 5 presentaron mayores alturas con respecto al grupo 1234. Se vio que los tratamientos 2 y 4 fueron notoriamente de menor altura, disminuyendo el promedio. Esto enmascara los valores de altura de los tratamientos 1 y 3 que se asemejan a los tratamientos 0 y 5. (Anexos cuadro 3)

Según la tabla que se presenta a continuación los tratamientos 1 y 3 presentan una altura superior, similar a los tratamientos sin *Trichoderma*.

Cuadro 5: Tabla de alturas promedio y error estándar según tratamientos

Tratamiento	Altura Promedio	Error estándar
0	24,3667 A	1,0008
1	22,62 A	1,0008
2	8,71 B	1,0008
3	21,67 A	1,0008
4	9,2 B	1,0008
5	22,026 A	1,0008

Nota: medias con igual letra, no difieren significativamente según el test de Tukey

Los tratamientos sin Trichosoil y con fertilización starter presentan mayor altura que los que tienen aplicación de Trichosoil y sin fertilización starter (Anexos Cuadro 3).

En el cuadro se muestran los contrastes realizados según la aplicación o no de Trichosoil y la aplicación o no de fertilización starter, para la variable altura.

Cuadro 6: Contrastes para la variable altura

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	22,67 A
Sin Fertilización starter	T2-T4	8,96 B

Letras iguales no difieren significativamente

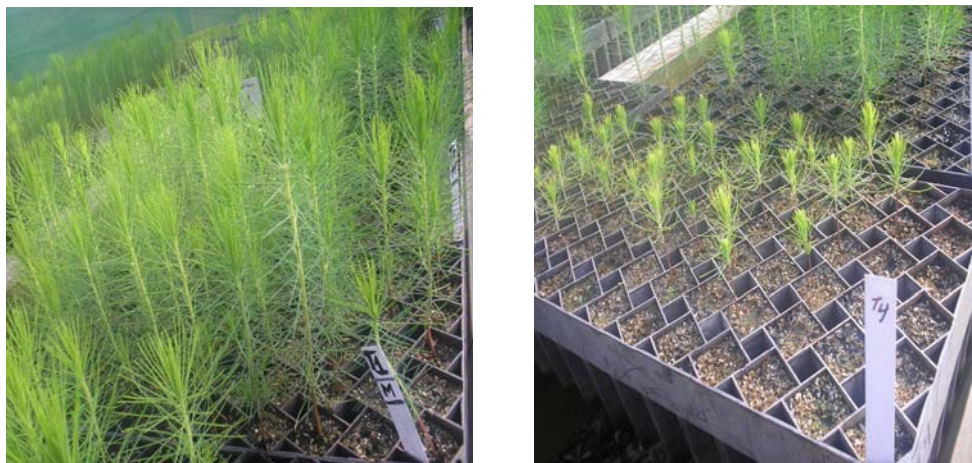


Figura 6: En estas 2 fotos se observan las diferencias entre los tratamientos 1 a la izquierda y 4 a la derecha en altura (fotos tomadas el 1° de febrero del 2007).

4.2 VARIABLE DIÁMETRO

En el análisis estadístico de esta variable, se observó un efecto de la aplicación de Trichosoil ($P < 0.0001$) que no fue el esperado, o sea los tratamientos con *Trichoderma* no presentaron mayor diámetro (Anexos cuadro 4), y un efecto de la aplicación starter ($P < 0.0001$), no detectándose un efecto de la dosis de Trichosoil. No se encontró interacción con la fecha de muestreo, concluyéndose que el efecto se mantuvo en el tiempo.

En el análisis estadístico se vio que las dosis de Trichosoil, la aplicación o no de fertilización starter y fecha, tuvieron un efecto diferente en la variable “diámetro”. Se mantiene la misma tendencia que para la variable altura.

Los tratamientos que presentaron mayor diámetro de cuello fueron 0, 1, 3 y 5 con un promedio de 0.28mm y los de menor tamaño fueron los tratamientos 2 y 4 con un promedio de 0.16mm (Anexos Cuadro 5).

Cuadro 7: Tabla de diámetro promedio y error estándar según tratamientos

Tratamientos	Diámetro promedio	Error estándar
0	0,292 A	0,006921
1	0,266 A	0,006921
2	0,1673 B	0,006921
3	0,28 A	0,006921
4	0,1607 B	0,006921
5	0,2867 A	0,006921

Nota: medias con igual letra, no difieren significativamente según el test de Tukey ($P < 0.05$)

Para la variable diámetro no existieron diferencias cuando se compararon los tratamientos con y sin Trichosoil pero aquellos tratamientos que no tuvieron fertilización starter presentaron un menor diámetro en relación con los que si fueron fertilizados.

En el cuadro se muestran los contrastes realizados según la aplicación o no de Trichosoil y la aplicación o no de fertilización starter para la variable diámetro.

Cuadro 8: contrastes para la variable diámetro

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	0,28 A
Sin Fertilización starter	T2-T4	0,16 B

Letras iguales no difieren significativamente

4.3 PESO FRESCO DE PARTE AÉREA

En el análisis estadístico se vio que los tratamientos, la aplicación o no de fertilización starter y fecha tuvieron un efecto diferente en la variable “peso fresco parte aérea”. Se mantiene la misma tendencia que para la variable altura (Anexos Cuadro 6).

Se hizo la prueba de Tukey y se observó que los tratamientos se diferenciaron de la siguiente manera: el tratamiento 0 fue el de mayor peso fresco, diferenciándose no significativamente de los tratamientos 3 y 5 pero si de los tratamientos 1, 2 y 4.

Cuadro 9: Tabla de peso fresco parte aérea promedio y error estándar según tratamientos.

Tratamientos	Peso fresco P aérea	Error estándar
0	15,917 A	0,6959
1	12,358 B	0,6959
2	2,251 C	0,6959
3	12,905 AB	0,6959
4	2,738 C	0,6959
5	13,877 AB	0,6959

Nota: medias con igual letra, no difieren significativamente según el test de Tukey ($P < 0.05$)

Para el peso fresco de la parte aérea se vieron diferencias cuando se compararon los tratamientos con y sin Trichosoil y con y sin fertilización starter, observándose que los mayores pesos se registraron sin aplicación de Trichosoil y con fertilización starter.

Cuadro 10: Promedio de los muestreos de los tratamientos para la variable peso fresco parte aérea presentados en forma de contrastes

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	13,76 A
Sin Fertilización starter	T2-T4	2,49 C

Letras iguales no difieren significativamente

4.4 PESO FRESCO DE PARTE RADICULAR

En el análisis estadístico se vio que los tratamientos, la aplicación o no de fertilización starter y fecha tuvieron un efecto diferente en la variable “peso fresco parte radicular”. Se mantiene la misma tendencia que para la variable altura (Anexos Cuadro 7).

Cuadro 11: Tabla de peso fresco parte radicular promedio y error estándar según tratamientos

Tratamientos	Peso fresco P _{radic}	Error estándar
0	9,435 A	0,2766
1	9,049 A	0,2766
2	1,2520 B	0,2766
3	8,806 A	0,2766
4	1,294 B	0,2766
5	9,446 A	0,2766

Nota: medias con igual letra, no difieren significativamente según el test de Tukey ($P < 0.05$)

El peso fresco de la parte radicular sigue el mismo comportamiento que el peso fresco de la parte aérea, las diferencias entre los tratamientos con y sin Trichosoil y, con y sin fertilización starter son significativas (Anexos Cuadro 8).

Cuadro 12: Promedio de los muestreos de los tratamientos para la variable peso fresco parte radicular presentados como contrastes

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	9,184 A
Sin Fertilización starter	T2-T4	1,273 C

Letras iguales no difieren significativamente

4.5 PESOS SECOS DE PARTE AÉREA Y PARTE RADICULAR

4.5.1 Peso seco parte aérea

En el análisis estadístico se vio que los tratamientos, la aplicación o no de fertilización starter y fecha tuvieron un efecto diferente en la variable “peso seco parte aérea” (Anexos Cuadro 9). Se mantiene la misma tendencia que para la variable altura.

Cuadro 13: Tabla de peso seco parte aérea promedio y error estándar según tratamientos.

Tratamientos	Peso seco P_aérea	Error estándar
0	3,937 A	0,21
1	3,116 A	0,21
2	0,69 B	0,21
3	3,271 A	0,21
4	0,673 B	0,21
5	3,84 A	0,21

Nota: medias con igual letra, no difieren significativamente según el test de Tukey ($P < 0.05$)

Los tratamientos que no fueron fertilizados con dosis starter presentaron un peso seco de la parte aérea mucho menor que aquellos que fueron fertilizados, los no tratados con Trichosoil presentaron un mayor peso comparados con aquellos en donde se aplicó este producto (Anexos Cuadro 10).

Cuadro 14: Promedio de los muestreos de los tratamientos para la variable peso seco parte aérea presentados como contrastes

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	3,541 A
Sin Fertilización starter	T2-T4	0,6815 B

Letras iguales no difieren significativamente

4.5.2 Peso seco de parte radicular

En el análisis estadístico se vio que los tratamientos, la aplicación o no de fertilización starter y fecha tuvieron un efecto diferente en la variable “peso seco parte radicular”. Se mantiene la misma tendencia que para la variable altura (Anexos Cuadro 11).

Cuadro 15: Tabla de peso seco parte radicular promedio y error estándar según tratamientos.

Tratamientos	Peso seco P radic	Error estándar
0	1,408 A	0,06736
1	1,283 A	0,06736
2	0,204 B	0,06736
3	1,417 A	0,06736
4	0,179 B	0,06736
5	1,556 A	0,06736

Nota: medias con igual letra, no difieren significativamente según el test de Tukey ($P < 0.05$)

Los tratamientos que no fueron fertilizados con dosis starter presentaron un peso seco de la parte radicular menor que aquellos que fueron fertilizados, los no tratados con Trichosoil presentaron un mayor peso comparados con aquellos en donde se aplicó este producto (Anexos Cuadro 12).

Cuadro 16: Promedio de los muestreos de los tratamientos para la variable peso seco parte radicular presentados como contrastes

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	1,416 A
Sin Fertilización starter	T2-T4	0,1915 B

Letras iguales no difieren significativamente

Para los parámetros morfológicos medidos como altura y diámetro de cuello, no se vio respuesta significativa frente al agregado de *Trichoderma harzianum*.

Para los parámetros fisiológicos como ser pesos frescos y secos de parte aérea y parte radicular, tampoco se vio respuesta significativa frente al agregado de *Trichoderma harzianum*.

4.6 ANÁLISIS FOLIAR

En las distintas fases de fertilización se aseguró que la aplicación fuera con el nutriente más necesario para la fase de desarrollo del plantín.

A continuación se presentan las tablas de niveles críticos y los 2 análisis foliares realizados.

Como se puede observar los resultados muestran que los diferentes tratamientos, tanto en la primera fecha de análisis como en la segunda presentan valores por encima del nivel crítico.

Cuadro 17: Niveles críticos de nutrientes para concentraciones foliares de *Pinus elliottii*

Nutriente	Rango típico ¹
N (%)	0,8-1,2
P (%)	0,085-0,09
K (%)	0,25-0,3
B (ppm)	4,0-8,0

¹: Rangos óptimos aproximados para concentraciones foliares en *P.elliottii* (Pritchett, citado por Cárdenas, 2003).

Para la primera fecha se puede observar que existen diferencias entre los tratamientos con y sin Trichosoil para el nutriente nitrógeno el cual aparece en los tratamientos con Trichosoil en un nivel mayor. Para los demás nutrientes no se ve el mismo comportamiento (Anexos cuadro 13).

Los niveles de nitrógeno para los tratamientos 2 y 4, fueron altamente superiores al rango típico, esto se debe a que recibieron la misma aplicación que los demás tratamientos pero su crecimiento fue menor por lo que el nutriente quedó en concentraciones más altas.

Cabe aclarar que el desbalance inicial de nutrientes explicado por la no fertilización starter con fósforo no se observa en los cuadros de análisis foliares presentados, debido a que éstos se realizaron luego de comenzado el programa de fertilización aplicado. El efecto observado de menor altura en los tratamientos que no fueron fertilizados con starter refleja que ocurrió el desbalance nutricional mencionado.³ Para poder avalar lo dicho anteriormente se debería haber realizado un análisis foliar previo a la etapa de fertilización de arranque.

Con respecto a la aplicación o no de fertilización starter se puede observar que los tratamientos que no fueron fertilizados presentan un nivel superior de nitrógeno en comparación con los que fueron fertilizados.

Esto se relaciona con el menor crecimiento de aquellos plantines sin fertilización starter, ya que el balance de nutrientes en este caso, implica una mayor oferta de N, lo cual según Buford y McKee, citados por Fernández et al. (2000), implica una pérdida en crecimiento que puede deberse a un incremento en la competencia de los microorganismos por el fósforo a consecuencia de un incremento poblacional como respuesta a una mayor oferta de N.

La absorción de nutrientes por las plantas en contenedor es elevada, pues las condiciones en el medio de crecimiento, tales como temperatura, nivel de humedad y pH, propician una rápida absorción de iones. El consumo excesivo de cualquiera de los 13 elementos minerales esenciales, es posible, pero las plantas acumulan elevados niveles de ciertos nutrientes (N,K) en mayor medida que otros.

Los niveles nutricionales elevados en el follaje, especialmente de N, pueden resultar dañinos. Las plantas toman el N rápidamente y parecen almacenarlo en el follaje, porque las concentraciones de N foliar continúan aumentando, sin que se presente un crecimiento adicional (Gilliam et al., 1980).

Swan, citado por Landis (1989) considera que los niveles foliares superiores de 2.5 a 2.8% de N, representan consumo excesivo, y en el caso de este ensayo los niveles de nitrógeno obtenido en ambos análisis foliares realizados fueron de 3,07 y 2,73% respectivamente, para los tratamientos que no tuvieron fertilización starter.

Timmer y Armstrong, citados por Landis (1989), encontraron que las elevadas tasas de fertilización con N, pueden reducir el peso y fibrosidad del sistema radical. Esto también fue observado en este ensayo, donde los tratamientos sin fertilización starter y por lo tanto mayor oferta de nitrógeno, presentaron menor peso fresco y seco de parte radicular.

Para la segunda fecha no se vieron diferencias entre los tratamientos con y sin Trichosoil para ninguno de los nutrientes. En cambio en la comparación de aplicación o no de fertilización starter se observan diferencias en el % de nitrógeno pero en los demás nutrientes no ocurre lo anterior (Anexos Cuadro 14).

³ del Pino, A. 2008. Com. personal

Cuadro 18: Datos promedios de los muestreos para las 2 fechas de análisis foliar y los contrastes para aplicación o no de Trichosoil y aplicación o no de fertilización starter

A. foliar 1° fecha	Tratamientos	%Nitrógeno	%Fósforo	%Potasio	Ppm B
Con Trichosoil	T1-T2-T3-T4	2,26	0,29	0,65	60,75
Sin Trichosoil	T0-T5	1,20	0,22	0,67	55,00

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	1,33	0,25	0,65	53,50
Sin Fertilización starter	T2-T4	3,07	0,29	0,66	69,50

A. foliar 2° fecha	Tratamientos	%Nitrógeno	%Fósforo	%Potasio	Ppm B
Con Trichosoil	T1-T2-T3-T4	2,18	0,31	0,96	17,50
Sin Trichosoil	T0-T5	1,88	0,37	0,97	18,50

Con Fertilización starter	T0-T1-T3-T5	1,72	0,33	0,94	17,25
Sin Fertilización starter	T2-T4	2,73	0,31	0,99	19,00

Debido a la importancia de la fertilización starter por su aporte inicial de fósforo el cual es requerido en el crecimiento inicial, al no aplicarse este nutriente, la planta recién germinada no tiene la energía suficiente para su posterior desarrollo. Por esta razón se podría explicar que la no aplicación de fertilización starter da como resultado plantas pequeñas, de escaso crecimiento, con reducido sistema radical y tallos delgados (Hernández, 1999).

Esto también se explica por que se genera una mayor oferta de N lo cual ocasiona consecuencias, por ejemplo se puede inhibir la formación de micorrizas y por lo tanto afectar la absorción de fósforo, también se vio que con elevadas tasas de fertilización con N, se puede reducir el peso y fibrosidad del sistema radical.

4.7 NIVEL DE *Trichoderma harzianum* EN EL SUSTRATO

A continuación se presentan los resultados obtenidos del conteo de UFC de *Trichoderma*.

Cuadro 19: Nivel de *Trichoderma harzianum* en el sustrato

Tratamientos	UFC/gr
0	$7 * 10^3$
1	$2,9 * 10^5$
2	$2,2 * 10^5$
3	$4,3 * 10^5$
4	$2,2 * 10^5$
5	$8 * 10^3$

Como se observa en la tabla anterior, los valores de los tratamientos inoculados con *Trichoderma* presentan mayor UFC/gr que aquellos que no fueron inoculados. Esta medida se realizó a los 4 meses de instalado el ensayo, lo que demuestra una buena sobrevivencia de *Trichoderma* en el sustrato.

Los tratamientos 0 y 5, los cuales no fueron inoculados con Trichosoil presentan UFC de *Trichoderma*, esto se debe a que es un organismo cosmopolita y es común encontrarlo a pesar de que no haya sido sembrado en el sustrato.

4.8 PEROXIDASAS

A continuación se presentan los resultados de la actividad de peroxidasas expresadas de 2 formas: unidades de enzima por gramo de material fresco utilizado y unidades de enzima por miligramo de proteínas extraídas.

La concentración de proteínas solubles se realizó por método de Biuret.

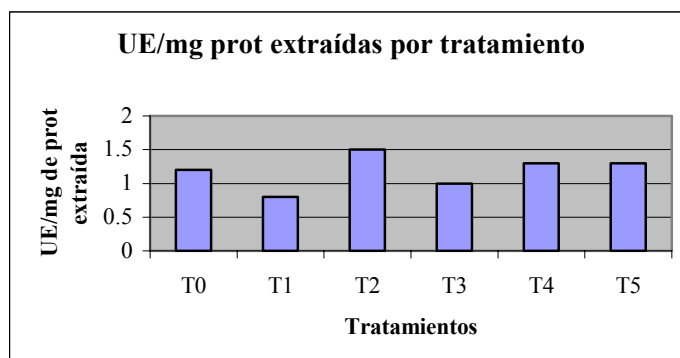
Cuadro 20: Resultados de la actividad peroxidasa (UE/gr de material fresco utilizado)

Tratamientos	(UE/gr de material fresco utilizado)
T0	7
T1	4.8
T2	13.1
T3	7.2
T4	6
T5	7.5

Cuadro 21: Resultados de la actividad peroxidasa (UE/ mg de proteína extraída)

Tratamientos	UE/mg proteína extraídas
T0	1.2
T1	0.8
T2	1.5
T3	1
T4	1.3
T5	1.3

Cuadro 22: Gráfica de UE/mg de proteína extraída según tratamientos



En los datos que se presentan se observa que no hay diferencia significativa en la actividad peroxidasa para los diferentes tratamientos.

Con respecto a los tratamientos que difieren en la aplicación o no de fertilización starter, así como la aplicación o no de diferentes dosis de *Trichoderma*, no se pudo inferir ninguna conclusión.

4.9 CORRELACIONES

La tabla presentada a continuación muestra las correlaciones entre la concentración de peroxidasas y las variables medidas en este ensayo.

Cuadro 23: Correlaciones entre la actividad peroxidasa y las variables medidas

	Peroxidasa	PF_PA	PF_PR	PS_PA	PS_PR	ALT	DIAM
Peroxidasa	1	-0,56223	-0,64482	-0,52454	-0,58186	-0,6579	-0,5695
Probabilidad de error		0,2455	0,1668	0,2854	0,2257	0,1555	0,238

Nota: El valor superior es el coeficiente de correlación observado, y el segundo es la probabilidad de error en la prueba estadístico con hipótesis $\rho=0$

Estas correlaciones fueron realizadas por medio del paquete estadístico SAS, a modo de realizar un análisis indirecto de la presencia de las peroxidasas en relación a las variables tenidas en cuenta. Cabe aclarar que dicho análisis es indirecto porque se hizo una sola medición de la concentración de peroxidasas (no hubo repeticiones), lo que no permitió aplicar un análisis estadístico apropiado.

Las correlaciones que se toman en consideración para su descripción son aquellas que presentan menor probabilidad de cometer error.

- Correlación “peroxidasa – peso fresco parte radicular”: presenta una relación negativa, esto significa que cuando el peso fresco de la parte radicular aumenta, la concentración de peroxidasas disminuye.
- Correlación “peroxidasa – altura”: presenta una relación negativa, esto significa que cuando la altura aumenta, la concentración de peroxidasas disminuye.

En cuanto a las demás correlaciones, no se consideraron para su descripción debido a que la probabilidad de error era elevada y por lo tanto no es conveniente inferir alguna conclusión a partir de las mismas.

5. CONCLUSIONES

La aplicación de Trichosoil (*Trichoderma harzianum* cepa L1) no promueve el crecimiento de los plantines de *Pinus taeda*.

No es viable la posibilidad de sustitución de la fertilización starter por la aplicación de *Trichoderma harzianum* cepa L1.

No se pudo constatar la posibilidad de que *Trichoderma harzianum* induzca resistencia (análisis de peroxidasas) en los plantines de *Pinus taeda*.

La colonización y sobrevivencia de *Trichoderma harzianum* en el sustrato se mantuvieron en niveles aceptables para su acción como biopromotor.

Para obtener resultados más confiables se deberían haber planteado otros tratamientos más contrastantes entre sí para una mejor visualización de lo que se quiere ensayar. Los tratamientos planteados fueron realizados pensando en los objetivos productivos del vivero, se debería haber tenido en cuenta los resultados obtenidos en ensayos realizados anteriormente con *Trichoderma* para continuar con la línea de investigación.

6. RESUMEN

Este ensayo fue llevado a cabo con el fin de seguir avanzando en la investigación del uso de *Trichoderma harzianum* como control biológico y biopromotor, siendo una herramienta en la implementación de un plan de manejo integrado. Se inoculó el sustrato en el mes de noviembre, con el hongo de interés colonizando al mismo y se llegó a un número de unidades formadoras de colonias acorde al número adecuado para un buen control de enfermedades. Se separaron diferentes pilas de sustrato según cantidad de Trichosoil aplicado. Luego de un mes de inoculado el sustrato se prosiguió a la siembra de las semillas de *Pinus taeda* proporcionada por el vivero “La Buena Unión” de la empresa Colonvade, en donde se realizó el ensayo. Cada tratamiento se diferenció según aplicación o no de Trichosoil y fue en esta etapa en donde se aplicó o no la fertilización starter. Los tratamientos que se plantearon fueron los siguientes: T0 como testigo; T1 con aplicación de starter y no de Trichosoil; T2 sin aplicación de starter y con dosis simple de Trichosoil; T3 con aplicación starter y el doble de dosis de Trichosoil; T4 sin aplicación starter y con dosis simple de Trichosoil; T5 como el testigo T0 pero otra semilla. Se llevaron las bandejas sembradas al invernáculo y se mantuvieron allí durante todo el ciclo de vivero. Se realizaron mediciones de parámetros morfológicos a partir del 13 de marzo, fecha en la cual las semillas de todos los tratamientos ya habían germinado y permitían la toma de altura y diámetro de cuello. A partir de la misma fecha se tomaron muestras para pesos frescos y secos de parte aérea y radicular de todos los tratamientos. Se obtuvo como resultados que la aplicación de fertilización starter fue determinante en el desarrollo de los plantines tanto en altura como en diámetro, lo que no se vio fue la respuesta a la aplicación de Trichosoil en ninguno de los parámetros medidos, pero esto si se observó en otros ensayos realizados anteriormente. A modo de profundizar en la investigación, se estudió la actividad peroxidasa frente a la presencia de *Trichoderma harzianum*, no obteniéndose ningún resultado concluyente debido a que no se realizaron las repeticiones correspondientes. Finalizando este resumen se puede decir que por más que no se llegaron a los resultados esperados, este ensayo ayuda a tener una fuente más de antecedentes, adaptada a las condiciones locales de producción de plantines de pino. También sirven como base para plantear ensayos en un futuro.

Palabras clave: Plantines; Sustrato; Vivero; *Pinus taeda*; *Trichoderma harzianum*; Fertilización; Biocontrol; Biopromotor.

7. SUMMARY

This trial was carried on in order to go deeper into the investigation of the use of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol and biopromoter agent and a tool in the implementation of an integrate plant management. The substrate was inoculated with the fungus *Trichoderma harzianum* in november and the survival was maintained during the cycle of the planting in acceptable levels for an appropriate control of diseases. The diferent piles of substrate were separated according to the dosis of *Trichoderma* applied in each one. The sowing of *Pinus taeda* seeds was made after a month of the inoculation of the substrate with the fungus. The seeds were provided by the breeding ground “La Buena Unión” (Colonvade S.A.), were the trial was made. Each treatment differed according to the aplication or not of Trichosoil and was at this fase, where the starter fertilization was applied. The treatments proposed were the following: T0 with stater fertilization, without Trichosoil; T1 with starter fertilization + 330g of Trichosoil; T2 without starter fertilization + 330g of Trichosoil; T3 with starter fertilization + 660g of Trichosoil; T4 without starter fertilization + 660g of Trichosoil; T5 Idem T0/ without cured seed. The sowed containers were taken to the breeding ground and keep there during the whole cycle. Evaluations of morphological parameters were made since March 13th, up to complete the total germination, so it was possible to take height and neck diameter measures. Also samples were taken to measure fresh and dry weight of the aerial and radicular zone for all treatments. The results showed that the aplication of starter fertilization was determinant in the development of the seedlings, as much in heigth as in neck diameter. The response to the application of Trichosoil was not seen in any measured parameters, but this was seen in other experiments previously done. In order to go deep into this investigation, a study on the peroxidase activity in the presence of *Trichoderma harzianum* was carried on. But the results obtained were not conclusive because the corresponding repetitions were not made. Finalizing this summary it can be concluded that the expected results were not reached, this trial is an important source of antecedents, adapted to the local conditions of *Pinus taeda* seedlings production in Uruguay. Also is a base for future trials in this subject.

Key words: Baby plants; Substrate; Breeding ground; *Pinus taeda*; *Trichoderma harzianum*; Fertilization; Biocontroller; Biopromoter.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G.N. 1996. Fitopatología. México, Limusa. 838 p.
2. AÑÓN, D.; LEVITAN, 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.
3. BENITEZ, T.; RINCÓN, A.; LIMÓN, M.; CODÓN, A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7:249-260.
4. BOTELLA, M.A.; QUESADA, M.A.; MEDINA, M.I.; PLIEGO, M.A.; VALPUESTA, V. 1994. Induction of a tomato peroxidase gene in vascular tissue. FEBS Lett (España). 347: 195-198.
5. CABRERA, R.; TEJERA, R. 2002. Evaluación de diferentes dosis de fertilización en la producción de plantines de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex maiden creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 156 p.
6. CARDENAS, D. 2003. Evaluación de calidad de plantines de *Eucalyptus globulus* spp. *globulus*, *Eucalyptus grandis* L. y *Pinus taeda* L. con la incorporación de sustrato con *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 198 p.
7. CARSOLIO, C., BENHAMOU, N., HARAN, S., CORTÉS, C., GUTIERREZ, A., CHET, I., HERRERA-ESTRELLA, A. 1999. Role of *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42 in mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology. 65: 929-935.
8. COZZOLINO, D. 1994. Determinación de materia seca con horno microondas. Colonia, Uruguay, INIA. 2 p.
9. ELAD, Y.; DAVID, T.; LEVI, A.; KAPAT, B. K. 1999. *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: Lyster, H.; Russell, P.E.; Dehne, H.W.; Sisler, H.D eds. Modern fungicides and antifungal compounds. Hants, Inglaterra, Intercept. pp. 459-467.

10. EZZIYYANI, M.; REQUENA, M.A.; CANDELA, M.E. 2005. Producción de proteínas- PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. Anales de Biología (Universidad de Murcia). 27: 143-153.
11. FERNANDEZ, R.; RODRIGUEZ ASPILLAGA, R.; PEZUTTI, R.; MARTIARENA, L.; COLCOMBET, E.; CRECHIL, E. 2000. Establecimiento de *Pinus taeda*. Crecimiento a los 34 meses como respuesta a la adición de N, P y K. Misiones, Argentina, INTA. 6 p.
12. FLEISCHER, S.; PACKER, L. 1974. Methods in enzymology. Biomembranes. New York, Academic Press. v.31, part A, 889 p.
13. FRIONI, L. 2006. Microbiología básica, ambiental y agrícola. Montevideo, Facultad de Agronomía. pp. 291-307.
14. HARMAN, G.; KUBICEK, C. 1998. Trichoderma and Gliocladium. Basic biology, taxonomy and genetics. London, Taylor and Francis. v. 1, 278 p.
15. HERNANDEZ, J. 1998 Mecanismo de la inactivación de peroxidasas vegetales por hidroperóxidos Implicación en procesos fisiológicos y biotecnológicos (en línea). Consultado oct. 2007. Disponible en:
http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/BOTANICA/FISIOLOGIA_VEGETAL/8
16. HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Microbiology. 29: 321-324.
17. _____. 2003. Mechanisms employed by trichoderma species in the biological control of plants diseases; the history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87(1): 4-9.
18. KAWAOKA, A.; MATSUNAGA, E.; ENDO, S.; KONDO, S.; YOSHIDA, K., SHINMYO, A.; EBINUMA, H. 2003. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. (en línea). Plant Physiology. 132: 1177–1185. Consultado dic. 2007. Disponible en
<http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/132/3/1177.pdf>

19. LANDIS, T.D. 1989. Mineral nutrients and fertilization. In: Landis, T.D.; Tinus R.W.; McDonald, S.E.; Barnett, J.P. The container tree nursery manual. Washington, D.C., USDA. pp. 1-67 (Agricultural Handbook no. 674).
20. LEVITUS, G. 2004. Mecanismos de defensa contra patógenos en plantas. (en línea). Porque Biotecnología. no. 93: 1p. Consultado set. 2007. Disponible en http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_93.asp
21. MONDINO, P.; VERO, S. 2006. Control biológico de patógenos. Montevideo, Facultad de Agronomía. 158 p.
22. OZBAY, N.; NEWMAN, S. 2004. Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T.harzianum*. Pakistan Journal of Biological Sciences 7(4): 478 – 484.
23. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN FORESTAL. 2005. Estadísticas (en línea). Montevideo. Consultado 30 ene. 2008. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/Sitios/SitiosdelMGAP.htm>
24. YEDIDIA, I., BENHAMOU, N., CHET, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied of Enviromental Microbiology. 65:1061-1070.

9. ANEXOS

Tabla 1 de medición de altura y diámetro de cuello

Medición de altura y
diámetro de cuello
Bloque N°1

13/03/2007

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
2	24	0,25	15	19,5	0,25	9	8	0,15
11	20	0,25	22	21,6	0,25	10	11	0,15
23	26,6	0,3	35	19,6	0,2	13	10,6	0,15
29	28	0,2	36	18	0,2	18	8	0,15
31	25,5	0,25	4	24,6	0,25	28	4,6	0,15
39	25,7	0,35	43	20	0,2	33	7,5	0,15
45	27	0,4	51	18	0,2	35	10	0,2
54	17,6	0,25	58	20	0,25	44	6	0,15
53	17,8	0,2	71	17	0,2	64	11	0,15
64	21	0,25	72	14,5	0,25	51	7,8	0,15
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
2	16	0,2	3	7,5	0,2	5	19	0,25
3	23	0,35	4	7	0,15	10	26	0,2
10	23,2	0,3	9	9	0,2	23	21,6	0,25
19	24	0,3	16	7,2	0,1	33	25	0,25
22	24,5	0,25	28	9,4	0,15	37	21,8	0,3
42	24,5	0,3	37	7,9	0,2	40	21	0,35
49	16,6	0,25	48	9,8	0,2	43	21,2	0,25
51	21	0,3	50	9,6	0,2	58	21,8	0,3
56	21,5	0,3	59	5,6	0,15	64	19,5	0,25
58	24	0,3	70	8,8	0,2	69	23	0,25

Bloque N°2

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
6	16,5	0,2	5	21,2	0,3	3	7,2	0,1
7	20,8	0,2	10	23,6	0,2	11	7,6	0,1
10	22,5	0,3	20	27	0,3	16	8	0,2
26	29	0,35	24	28,6	0,25	26	7,8	0,2
39	18	0,2	28	29,5	0,3	28	8,8	0,15
45	26,4	0,2	32	21	0,2	41	7	0,15
49	25,8	0,3	35	28,6	0,25	52	9,5	0,2
58	24,6	0,25	45	23,4	0,25	54	8,6	0,25
66	24	0,25	53	24,2	0,25	58	8,5	0,2
68	23	0,3	64	20,5	0,25	66	8,4	0,15
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
1	21	0,4	9	7,5	0,15	13	17,2	0,35
15	21,5	0,2	17	8	0,15	17	19,4	0,3
22	17,8	0,25	21	7,5	0,2	28	21,4	0,3
30	19,6	0,25	29	6	0,15	32	20	0,25
32	17,5	0,35	34	5,6	0,15	34	22	0,25
46	11	0,2	39	5	0,1	36	22,5	0,2
50	23	0,2	42	10	0,2	43	15	0,3
54	25,4	0,3	46	10,3	0,2	45	22,2	0,25
58	19,4	0,25	59	8,5	0,3	53	17	0,3
59	18,6	0,25	65	7,5	0,2	63	12,4	0,25

Bloque N° 3

	T0			T1			T2		
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	
3	20,7	0,2	1	17,5	0,15	8	6,7	0,1	
12	22	0,25	6	11,5	0,1	10	10,5	0,15	
15	23,8	0,3	9	17,7	0,15	15	5	0,1	
17	21,4	0,25	17	23,5	0,2	22	7	0,15	
18	22,7	0,2	24	22	0,25	35	5	0,15	
44	10,5	0,15	25	24,6	0,254	44	5,3	0,15	
54	12	0,15	44	23,5	0,2	53	5,1	0,1	
61	16,1	0,15	54	19,5	0,2	57	5,5	0,1	
62	20,6	0,25	61	22,1	0,2	60	8,8	0,15	
66	18,5	0,2	64	20,2	0,2	70	6,5	0,15	
	T3			T4			T5		
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	
11	12,1	0,1	4	8,1	0,15	5	26,5	0,25	
13	16,9	0,15	14	4,5	0,1	7	20,6	0,25	
15	18,1	0,2	16	6	0,1	8	24	0,25	
25	19	0,3	22	8	0,15	17	19,3	0,25	
30	18,5	0,2	34	4,2	0,1	24	19,1	0,25	
45	19	0,25	42	6	0,1	28	24,2	0,3	
56	20	0,3	44	8,1	0,15	49	15	0,2	
62	13,5	0,2	51	10	0,1	56	18,7	0,2	
64	17,5	0,3	59	12,3	0,15	59	16,9	0,2	
67	17	0,2	68	5,4	0,1	62	22,5	0,2	

Bloque N° 4

	T0			T1			T2		
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	
3	23,5	0,25	6	19	0,22	8	6	0,15	
10	22	0,3	15	20	0,2	11	5	0,15	
21	22,8	0,3	25	16	0,21	20	5,5	0,12	
29	21	0,3	29	19	0,25	21	5,6	0,14	
32	23,5	0,28	35	18,5	0,25	28	10	0,16	
45	29	0,3	39	22,8	0,2	38	5	0,15	
54	27	0,3	44	20,5	0,25	41	8	0,18	
56	28,5	0,28	53	21,2	0,2	43	7,8	0,18	
63	26	0,25	61	16,5	0,22	45	8,4	0,19	
67	24	0,31	65	18,8	0,25	57	8,3	0,12	
	T3			T4			T5		
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	
1	17,2	0,25	5	6,8	0,12	6	21,8	0,26	
11	20,5	0,18	10	11,5	0,2	7	24,2	0,2	
22	20	0,25	21	5,5	0,1	22	22,8	0,21	
29	23,5	0,3	23	8	0,11	35	24,6	0,28	
40	20,5	0,25	38	9,6	0,18	38	32	0,23	
47	25,5	0,28	40	7	0,12	16	26,2	0,21	
52	20	0,32	43	11	0,18	50	29	0,25	
60	23	0,28	58	7,5	0,14	58	26,5	0,3	
65	20,5	0,25	60	5,5	0,1	69	27	0,3	
68	20,2	0,25	67	7,6	0,1	62	21,2	0,38	

Bloque N° 5

	T0			T1			T2		
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	
4	16	0,2	18	19,5	0,21	9	5,4	0,11	
10	13	0,2	27	20,5	0,24	11	6,5	0,15	
13	17	0,22	29	26,5	0,3	12	6,4	0,1	
25	26,5	0,28	32	24,5	0,28	15	5,4	0,1	
33	15,5	0,25	43	17,5	0,25	34	5,6	0,15	
36	30	0,3	46	29,5	0,25	41	7	0,11	
56	24,5	0,3	47	21,8	0,24	43	6,6	0,18	
57	24	0,3	54	22,5	0,28	51	3,8	0,1	
60	30	0,4	58	22	0,22	60	8,8	0,11	
62	22	0,25	42	19	0,2	71	12	0,11	
	T3			T4			T5		
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	
5	8,5	0,15	9	4,5	0,15	12	20	0,2	
6	21,5	0,25	16	7,3	0,12	18	17,2	0,2	
16	23	0,28	23	10	0,12	21	14,1	0,22	
24	26,5	0,22	24	6	0,15	27	23,8	0,28	
28	20	0,24	33	11,5	0,18	30	24,1	0,25	
41	21	0,3	54	5	0,15	34	15	0,3	
46	25,5	0,28	59	8	0,12	37	10	0,3	
50	24	0,3	62	8	0,16	42	23,5	0,3	
53	20	0,25	65	6	0,1	65	16	0,2	
69	25	0,28	70	12	0,11	72	22,6	0,25	

Medición de
altura y
diámetro de
cuello

28/03/2007

Bloque N° 1

	T0			T1			T2		
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	
2	25,5	0,3	15	20	0,3	9	7	0,2	
11	20,5	0,3	22	21,5	0,3	10	10,1	0,2	
23	28	0,35	35	20,5	0,25	13	10,6	0,15	
29	27,5	0,25	36	18	0,25	18	8	0,2	
31	24,5	0,3	4	26	0,3	28	4,6	0,2	
39	26	0,4	43	20,5	0,3	33	7,5	0,2	
45	27	0,4	51	19	0,25	35	10	0,15	
54	20	0,3	58	20	0,3	44	6	0,2	
53	17	0,25	71	16	0,25	64	11,5	0,2	
64	21,5	0,3	72	16,5	0,3	51	8	0,2	
	T3			T4			T5		
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	
2	15	0,25	3	7,5	0,2	5	20	0,3	
3	24	0,35	4	5,5	0,2	10	25,4	0,3	
10	23,5	0,3	9	8	0,2	23	21	0,3	
19	25,5	0,3	16	6,7	0,15	33	26	0,3	
22	25,2	0,3	28	10	0,2	37	21,5	0,35	
42	24	0,35	37	6,6	0,2	40	21,5	0,35	
49	16	0,3	48	8,5	0,2	43	21	0,3	
51	20,5	0,3	50	8,5	0,2	58	23	0,3	
56	22	0,3	59	6,2	0,15	64	18,5	0,25	
58	24,2	0,3	70	8,5	0,2	69	23	0,3	

Bloque N° 2

	T0			T1			T2		
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	
6	16	0,2	5	20	0,3	3	8	0,2	
7	21,5	0,25	10	24	0,3	11	8,5	0,15	
10	23,5	0,3	20	28	0,3	16	9,5	0,2	
26	29,6	0,3	24	30	0,3	26	7,5	0,2	
39	18	0,3	28	31	0,35	28	9,6	0,2	
45	27	0,3	32	22,5	0,3	41	7,5	0,15	
49	27	0,3	35	28,7	0,3	52	9,5	0,2	
58	25	0,3	45	26,1	0,35	54	7,7	0,2	
66	23	0,3	53	26	0,3	58	7,6	0,2	
68	23,2	0,35	64	19	0,3	66	8	0,2	
	T3			T4			T5		
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	
1	21,5	0,4	9	7	0,2	13	17	0,35	
15	21,5	0,3	17	8,5	0,2	17	8,5	0,3	
22	18	0,3	21	8,5	0,2	28	21,6	0,35	
30	18,6	0,35	29	6,5	0,2	32	20	0,3	
32	17,5	0,3	34	6,5	0,15	34	22,5	0,35	
46	11,5	0,25	39	5	0,15	36	22,5	0,3	
50	23	0,25	42	9	0,2	43	15	0,3	
54	24,5	0,35	46	10,5	0,2	45	23,5	0,3	
58	20	0,3	59	8,5	0,2	53	16	0,3	
59	18,5	0,3	65	7,5	0,2	63	12,5	0,25	

Bloque N° 3

	T0			T1			T2	
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro
3	23	0,3	1	18,5	0,2	8	7	0,15
12	23,5	0,3	6	13,5	0,15	10	12,5	0,15
15	26,5	0,35	9	21,1	0,2	15	6	0,1
17	23,5	0,3	17	25	0,25	22	7,2	0,2
18	23,5	0,25	24	25	0,3	35	5	0,15
44	11	0,2	25	26,6	0,3	44	5,5	0,2
54	12	0,2	44	25,6	0,25	53	6,5	0,2
61	18	0,15	54	21,5	0,25	57	5,5	0,15
62	22	0,3	61	24	0,25	60	10	0,2
66	20	0,25	64	22,5	0,25	70	7,5	0,2
	T3			T4			T5	
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro
11	12,5	0,25	4	10	0,15	5	28,5	0,25
13	17,5	0,25	14	7	0,1	7	21,5	0,3
15	19,5	0,25	16	7,5	0,1	8	26	0,25
25	21,5	0,3	22	9,5	0,2	17	21,2	0,3
30	19	0,3	34	5,5	0,1	24	21	0,25
45	20,5	0,3	42	8,5	0,15	28	26,5	0,3
56	21,5	0,3	44	11	0,2	49	15,5	0,2
62	14,5	0,25	51	11	0,2	56	20,5	0,3
64	18,5	0,3	59	13,5	0,2	59	18	0,3
67	18,5	0,25	68	6,5	0,1	62	23	0,3

Bloque N° 4

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
3	26,2	0,3	6	20	0,3	8	7	0,15
10	24,1	0,3	15	21	0,25	11	5	0,15
21	24,8	0,3	25	17,6	0,25	20	7,2	0,15
29	23,1	0,35	29	20,5	0,3	21	6	0,15
32	26,4	0,3	35	20,4	0,3	28	10,5	0,15
45	32	0,3	39	25	0,25	38	6	0,15
54	29,8	0,4	44	22,1	0,3	41	10,2	0,2
56	30,8	0,3	53	23,6	0,25	43	8	0,2
63	28	0,3	61	18,5	0,3	45	10	0,2
67	27	0,35	65	20,8	0,3	57	10,1	0,15
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
1	17,2	0,25	5	6,8	0,12	6	21,8	0,26
11	20,5	0,18	10	11,5	0,2	7	24,2	0,2
22	20	0,25	21	5,5	0,1	22	22,8	0,21
29	23,5	0,3	23	8	0,11	35	24,6	0,28
40	20,5	0,25	38	9,6	0,18	38	32	0,23
47	25,5	0,28	40	7	0,12	46	26,2	0,21
52	20	0,32	43	11	0,18	50	29	0,25
60	23	0,28	58	7,5	0,14	58	26,5	0,3
65	20,5	0,25	60	5,5	0,1	69	27	0,3
68	20,2	0,25	67	7,6	0,1	62	21,2	0,38

Bloque N° 5

	T0			T1			T2	
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro
4	18,5	0,25	18	22,4	0,3	9	8	0,15
10	15,5	0,25	27	23	0,3	11	8,1	0,15
13	19	0,3	29	29	0,3	12	7,5	0,15
25	28	0,3	32	26,5	0,3	15	6,2	0,15
33	18,8	0,25	43	19,1	0,3	34	6	0,15
36	33	0,3	46	26,1	0,3	41	7,3	0,15
56	26	0,3	47	24	0,3	43	8,5	0,2
57	26,5	0,3	54	24	0,3	51	5,2	0,15
60	33	0,4	58	24,5	0,25	60	10	0,2
62	24,7	0,3	42	20	0,3	71	12,6	0,2
	T3			T4			T5	
Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro	Nº plantín	Altura	Diámetro
5	10	0,15	9	7	0,15	12	20,2	0,25
6	23,8	0,3	16	7,9	0,12	18	18,6	0,25
16	25,5	0,3	23	13	0,12	21	14,5	0,3
24	28,5	0,25	24	8,5	0,15	27	26	0,3
28	22,7	0,3	33	15,1	0,18	30	25,7	0,25
41	24,5	0,3	54	6,9	0,15	34	19,1	0,3
46	28,8	0,35	59	9,1	0,12	37	11	0,25
50	28	0,35	62	11,2	0,16	42	25	0,3
53	20,5	0,35	65	6,7	0,1	65	17,5	0,25
69	27	0,4	70	13,1	0,11	72	25,2	0,25

Medición de
altura y
diámetro de
cuello
Bloque N°1

20/04/2007

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
2	30,2	0,3	15	23,5	0,3	9	11,2	0,2
11	24	0,2	22	25,6	0,3	10	15	0,2
23	32	0,35	35	24,6	0,3	13	14,6	0,2
29	31,3	0,3	36	23	0,3	18	12	0,2
31	28	0,25	4	29,5	0,4	28	8	0,15
39	30,5	0,3	43	22,8	0,3	33	10,8	0,2
45	32,5	0,3	51	22,2	0,3	35	10,5	0,2
54	22,8	0,3	58	23,9	0,3	44	15,2	0,2
53	21	0,3	71	19,5	0,3	64	14,6	0,2
64	25,5	0,3	72	20,1	0,25	51	12	0,2
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
2	17	0,3	3	12,5	0,2	5	24,1	0,3
3	27	0,35	4	9	0,15	10	27,2	0,3
10	25	0,35	9	12,6	0,2	23	25	0,4
19	28,2	0,3	16	11,4	0,2	33	30,5	0,3
22	28,5	0,3	28	15,2	0,15	37	26,4	0,4
42	27,5	0,3	37	10	0,15	40	25,8	0,4
49	17,8	0,35	48	9,8	0,15	43	26,4	0,3
51	23,5	0,3	50	11,9	0,2	58	27,8	0,35
56	25	0,3	59	10,2	0,2	64	20,5	0,35
58	26,8	0,35	70	11,6	0,2	69	26,8	0,35

Bloque N° 2

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
6	h	0,25	5	h	0,3	3	6	0,18
7	h	0,3	10	h	0,3	11	8,2	0,18
10	h	0,3	20	h	0,3	16	h	0,2
26	h	0,25	24	h	0,25	26	11,5	0,18
39	h	0,3	28	h	0,3	28	h	0,16
45	h	0,22	32	h	0,28	41	8	0,18
49	h	0,3	35	h	0,35	52	8,5	0,2
58	h	0,3	45	h	0,28	54	10	0,18
66	h	0,3	53	h	0,28	58	6,5	0,15
68	h	0,3	64	h	0,25	66	10	0,18
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
1	h	0,3	9	h	0,15	13	h	0,3
15	h	0,27	17	8,3	0,13	17	h	0,15
22	h	0,26	21	6,2	0,2	28	h	0,3
30	19	0,3	29	5,5	0,2	32	h	0,28
32	15,4	0,3	34	8,8	0,13	34	h	0,28
46	14,5	0,22	39	h	0,1	36	h	0,25
50	21,5	0,23	42	10	0,15	43	h	0,25
54	25,5	0,32	46	8,3	0,15	45	h	0,3
58	21	0,3	59	9,5	0,12	53	h	0,3
59	18	0,25	65	10	0,18	63	15	0,28

Bloque N° 3

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
3	h	0,3	1	21,5	0,25	8	11	0,15
12	26,5	0,4	6	17,3	0,15	10	19	0,2
15	30	0,4	9	h	0,2	15	10	0,15
17	17,3	0,35	17	28,5	0,3	22	11,5	0,15
18	26	0,4	24	29,5	0,35	35	8,5	0,15
44	h	0,3	25	h	0,3	44	10,5	0,2
54	15	0,3	44	h	0,3	53	11,2	0,15
61	h	0,3	54	h	0,3	57	10	0,15
62	h	0,35	61	21,5	0,25	60	15	0,15
66	h	0,3	64	h	0,2	70	11	0,15
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
11	15	0,3	4	13	0,18	5	h	0,25
13	19,7	0,3	14	8	0,15	7	h	0,35
15	23,5	0,25	16	h	0,22	8	h	0,32
25	25,5	0,3	22	13,5	0,2	17	h	0,32
30	23	0,3	34	7,5	0,15	24	19	0,28
45	23	0,3	42	h	0,1	28	24	0,3
56	25,7	0,3	44	13,5	0,2	49	15,5	0,25
62	18	0,2	51	h	0,2	56	18,5	0,32
64	22,5	0,3	59	18	0,18	59	19	0,3
67	23,5	0,35	68	8,5	0,15	62	22,5	0,32

Bloque N° 4

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
3	28,5	0,5	6	20,5	0,3	8	9,5	0,2
10	25,5	0,35	15	21	0,2	11	7	0,15
21	25	0,3	25	18	0,3	20	9	0,15
29	24	0,35	29	21	0,3	21	11	0,2
32	29	0,4	35	21,5	0,25	28	12	0,15
45	36	0,4	39	27	0,2	38	10	0,15
54	33	0,4	44	22,5	0,25	41	12	0,15
56	33	0,4	53	25,5	0,2	43	12,5	0,2
63	32	0,4	61	19	0,3	45	12	0,2
67	30	0,35	65	22	0,25	57	11	0,15
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
1	21	0,3	5	11	0,15	6	27,5	0,35
11	25	0,3	10	13,5	0,2	7	28	0,4
22	20,5	0,3	21	6	0,1	22	32	0,3
29	28,5	0,35	23	12	0,2	35	29	0,35
40	25,5	0,3	38	15,5	0,2	38	40	0,4
47	33	0,3	40	11	0,15	46	32	0,3
52	24	0,25	43	15	0,15	50	37	0,35
60	27,5	0,3	58	12	0,15	58	32	0,35
65	25	0,25	60	7	0,1	69	30	0,3
68	24	0,3	67	13	0,2	62	27	0,35

Bloque N° 5

	T0			T1			T2	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
4	20	0,2	18	24,5	0,3	9	10,5	0,2
10	18	0,3	27	27	0,3	11	11,5	0,2
13	20,6	0,3	29	33	0,35	12	10	0,2
25	31	0,25	32	30	0,35	15	10	0,15
33	22	0,3	43	23,6	0,25	34	8,5	0,15
36	39	0,35	46	30,5	0,3	41	11,5	0,2
56	28	0,25	47	28,2	0,2	43	9	0,2
57	30,2	0,4	54	28,5	0,35	51	8	0,1
60	39	0,35	58	29,5	0,3	60	12	0,2
62	26,5	0,3	42	22,7	0,25	71	14,5	0,2
	T3			T4			T5	
N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro	N° plantín	Altura	Diámetro
5	14,5	0,2	9	10,2	0,2	12	24	0,3
6	27,5	0,4	16	12	0,15	18	22	0,35
16	29,5	0,3	23	18	0,2	21	17,5	0,2
24	31,5	0,3	24	12,5	0,2	27	30,5	0,4
28	28	0,3	33	17,5	0,2	30	28,5	0,3
41	28,5	0,35	54	11	0,15	34	25,5	0,3
46	32	0,35	59	12,8	0,15	37	15	0,2
50	32	0,35	62	15,5	0,2	42	28,5	0,4
53	25	0,3	65	11	0,15	65	21,5	0,2
69	30	0,4	70	17,5	0,15	72	30	0,35

Tabla 2: Determinación del peso fresco y seco de los plantines. Fecha 14/03/07

Bloque 1

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	14,77	7,81	22,58	3,026	0,73	3,756
T1	11,88	7,52	19,4	3,12	0,906	4,026
T2	1,93	0,76	2,69	0,65	0,186	0,836
T3	11,88	7,33	19,21	3	0,866	3,866
T4	2,2	1,08	3,28	0,266	0,066	0,332
T5	13,01	6,21	19,22	3,25	0,88	4,13

Bloque 2

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	14,66	6,61	21,27	3,86	0,893	4,753
T1	15,29	9,51	24,8	3,84	0,51	4,35
T2	1,6	0,68	2,28	0,68	0,173	0,853
T3	8,01	6,81	14,82	1,91	0,92	2,83
T4	2,24	0,97	3,21	0,73	0,2	0,93
T5	8,86	5,52	14,38	2,26	0,586	2,846

Bloque 3

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	11,36	7,37	18,73	2,853	1,026	3,879
T1	9,8	6,6	16,4	2,506	1,026	3,532
T2	1,81	0,97	2,78	0,626	0,173	0,799
T3	12,05	7,91	19,96	2,933	1,066	3,999
T4	2,6	1,24	3,84	0,84	0,28	1,12
T5	13,1	8,37	21,47	3,493	0,84	4,333

Bloque 4

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	12,93	8,06	20,99	3,2	1,146	4,346
T1	8,2	5,266	13,466	1,88	0,56	2,44
T2	1,893	1	2,893	0,706	0,226	0,932
T3	11,42	7,44	18,86	2,813	1,413	4,226
T4	1,84	0,8	2,64	0,613	0,186	0,799
T5	13,21	6,76	19,97	3,346	1,16	4,506

Bloque 5

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	11,94	8,34	20,28	2,88	0,973	3,853
T1	8,86	6,88	15,74	2,08	0,73	2,81
T2	1,733	0,99	2,723	6	0,186	6,186
T3	11,66	7,706	19,366	2,8	1,1066	3,9066
T4	1,8	0,8	2,6	0,813	0,226	1,039
T5	10,946	6,8	17,746	2,613	1,13	3,743

Determinación del peso fresco y seco de los plantines. Fecha 24/04/07

Bloque 1

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	21,58	11,1	32,68	4,61	1,41	6,02
T1	14,54	10,68	25,22	3,21	1,85	5,06
T2	2,88	1,25	4,13	0,73	0,22	0,95
T3	16,02	12,35	28,37	3,94	2,25	6,19
T4	2,6	1,08	3,68	0,58	0,17	0,75
T5	15,97	12,34	28,31	4,52	2,11	6,63

Bloque 2

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	19,05	13,05	32,1	4,93	2,39	7,32
T1	13,57	8,54	22,11	3,57	1,58	5,15
T2	2,44	1,28	3,72	0,6	0,21	0,81
T3	13,85	8,11	21,96	3,71	1,67	5,38
T4	2,32	1,02	3,34	0,57	0,18	0,75
T5	11,55	12,77	24,32	3,17	2,39	5,56

Bloque 3

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	14,95	10,75	25,7	4,24	2,18	6,42
T1	13,52	13,79	27,31	4,03	2,34	6,37
T2	3,3	1,93	5,23	0,78	0,34	1,12
T3	13,91	11,16	25,07	3,79	2,03	5,82
T4	3,6	1,95	5,55	0,9	0,29	1,19
T5	13,72	13,07	26,79	3,79	2,38	6,17

Bloque 4

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	21,81	10,06	31,87	5,43	1,64	7,07
T1	13,37	10,88	24,25	3,24	1,54	4,78
T2	3,9	1,8	5,7	0,81	0,12	0,93
T3	16,95	11,08	28,03	4,55	1,57	6,12
T4	5,49	2,6	8,09	0,94	0,07	1,01
T5	21,82	12,44	34,26	7,06	2,06	9,12

Bloque 5

	Peso fresco			Peso seco		
	Parte aérea	Parte radicular	Total	Parte aérea	Parte radicular	Total
T0	16,12	11,2	27,32	4,34	1,69	6,03
T1	14,55	10,88	25,43	3,68	1,78	5,46
T2	3,62	1,86	5,48	0,71	0,2	0,91
T3	13,3	8,16	21,46	3,27	1,27	4,54
T4	2,69	1,4	4,09	0,48	0,11	0,59
T5	16,58	10,18	26,76	4,9	1,85	6,75

Cuadro1: Análisis de varianza para la variable altura

Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
Bloque	4	20	1.91	0.1475
TRATAM	2	20	40.27	<.0001
STARTER (TRATAM)	1	20	173.70	<.0001
DOSIS (TRATAM)	1	20	0.05	0.8206
STARTE*DOSIS (TRATAM)	1	20	0.51	0.4822
Fecha	2	48	32.86	<.0001
TRATAM*Fecha	4	48	0.70	0.5951
STARTE*Fecha(TRATAM)	2	48	0.40	0.6710
DOSIS*Fecha(TRATAM)	2	48	0.32	0.7250
STAR*DOSI*Fech(TRAT)	2	48	0.31	0.7371

Cuadro 2: Promedios para la variable altura según tratamientos

Efecto	Starter	Tratam	Dosis	Prom Altura
Starter*dosis(tratam) si	0	0		24,3667
Starter*dosis(tratam) si	5	0		22,0267
Starter*dosis(tratam) no	1234	330		8,7133
Starter*dosis(tratam) no	1234	660		9,2
Starter*dosis(tratam) si	1234	330		22,62
Starter*dosis(tratam) si	1234	660		21,6733

Cuadro 3: Promedio de altura según tratamientos

Prueba Tukey		
Tratamiento	Promedio	Letra
0	24,3667	A
5	22,0267	A
1234	15,5517	B

Cuadro 4: Análisis de varianza para la variable diámetro de cuello

Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
Bloque	4	20	4.32	0.0111
TRATAM	2	20	69.97	<.0001
STARTER(TRATAM)	1	20	248.00	<.0001
DOSIS(TRATAM)	1	20	0.28	0.6021
STARTE*DOSIS(TRATAM)	1	20	2.23	0.1511
Fecha	2	48	28.25	<.0001
TRATAM*Fecha	4	48	1.71	0.1630
STARTE*Fecha(TRATAM)	2	48	1.36	0.2670
DOSIS*Fecha(TRATAM)	2	48	1.41	0.2547
STAR*DOSI*Fech(TRAT)	2	48	0.19	0.8236

Cuadro 5: Promedio de diámetro de los diferentes tratamientos

Tmtos	Starter	Dosis	Diámetro	Letra
0	Si	0	0,292	A
5	Si	0	0,2867	A
3	Si	660	0,28	A
1	Si	330	0,266	A
2	no	330	0,1673	B
4	no	660	0,1607	B

Cuadro 6: análisis de varianza para la variable peso fresco parte aérea

Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
Bloque	4	20	1.59	0.2159
TRATAM	2	20	74.90	<.0001
STARTER(TRATAM)	1	20	206.83	<.0001
DOSIS(TRATAM)	1	20	0.31	0.5838
STARTE*DOSIS(TRATAM)	1	20	0.05	0.8210
Fecha	1	24	70.88	<.0001
TRATAM*Fecha	2	24	4.64	0.0198
STARTE*Fecha(TRATAM)	1	24	4.65	0.0413
DOSIS*Fecha(TRATAM)	1	24	0.06	0.8158
STAR*DOSI*Fech(TRAT)	1	24	0.22	0.6426

Cuadro 7: Análisis de varianza para la variable peso fresco parte radicular

Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
Bloque	4	20	1.85	0.1583
TRATAM	2	20	164.13	<.0001
STARTER(TRATAM)	1	20	765.73	<.0001
DOSIS(TRATAM)	1	20	0.13	0.7202
STARTE*DOSIS(TRATAM)	1	20	0.27	0.6121
Fecha	1	24	92.09	<.0001
TRATAM*Fecha	2	24	8.40	0.0017
STARTE*Fecha(TRATAM)	1	24	10.82	0.0031
DOSIS*Fecha(TRATAM)	1	24	0.56	0.4630
STAR*DOSI*Fech(TRAT)	1	24	0.36	0.5525

Cuadro 8: Promedio de los diferentes tratamientos para Peso fresco parte radicular

Tratamiento	Starter	Dosis	Peso (grs)	Letra
5	Si	0	9,446	A
0	Si	0	9,435	A
1	Si	330	9,049	A
3	Si	660	8,806	A
4	No	330	1,294	B
2	No	660	1,252	B

Cuadro 9: Análisis de varianza para la variable peso seco parte aérea

Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
Bloque	4	20	0.84	0.5186
TRATAM	2	20	57.60	<.0001
STARTER(TRATAM)	1	20	143.09	<.0001
DOSIS(TRATAM)	1	20	0.11	0.7459
STARTE*DOSIS(TRATAM)	1	20	0.17	0.6865
Fecha	1	24	59.43	<.0001
TRATAM*Fecha	2	24	7.49	0.0030
STARTE*Fecha(TRATAM)	1	24	8.59	0.0073
DOSIS*Fecha(TRATAM)	1	24	0.17	0.6798
STAR*DOSI*Fech(TRAT)	1	24	0.26	0.6147

Cuadro 10: Promedio de los diferentes tratamientos para Peso seco parte aérea

Tratamientos	Starter	Dosis	Letra
0	Si	0	A
5	Si	0	A
3	Si	660	A
1	Si	330	A
2	No	330	B
4	No	660	B

Cuadro 11: Análisis de varianza para la variable peso seco parte radicular

Effect	DF	DF	F Value	Pr > F
Bloque	4	20	2.06	0.1237
TRATAM	2	20	75.54	<.0001
STARTER(TRATAM)	1	20	295.83	<.0001
DOSIS(TRATAM)	1	20	0.65	0.4280
STARTE*DOSIS(TRATAM)	1	20	1.39	0.2517
Fecha	1	24	122.51	<.0001
TRATAM*Fecha	2	24	11.34	0.0003
STARTE*Fecha(TRATAM)	1	24	31.48	<.0001
DOSIS*Fecha(TRATAM)	1	24	2.04	0.1665
STAR*DOSI*Fech(TRAT)	1	24	1.11	0.3016

Cuadro 12: Promedio de los diferentes tratamientos para Peso seco parte radicular

Tratamientos	Starter	Dosis	Letra
5	Si	0	A
3	Si	0	A
0	Si	660	A
1	Si	330	A
2	No	330	B
4	No	660	B

Cuadro13: Niveles de nutrientes obtenidos en el primer análisis foliar

Tratamientos	Nutrientes			
	N (%)	P (%)	K (%)	B (ppm)
T0	1,18	0,24	0,71	56
T1	1,52	0,3	0,62	53
T2	3,1	0,27	0,58	72
T3	1,39	0,26	0,65	51
T4	3,03	0,31	0,73	67
T5	1,21	0,2	0,62	54

Cuadro 14: Niveles de nutrientes obtenido en el segundo análisis foliar

Tratamientos	Nutrientes			
	N (%)	P (%)	K (%)	B (ppm)
T0	1,88	0,37	0,97	19
T1	1,6	0,29	0,89	18
T2	2,69	0,33	0,96	22
T3	1,67	0,33	0,97	14
T4	2,77	0,28	1,02	16
T5	1,81	0,35	1,04	18

Cuadro: Tabla de correlaciones entre peroxidasas y las variables medidas en el ensayo

	Peroxidasa	PF_PA	PF_PR	PS_PA	PS_PR	ALT	DIAM
Peroxidasa	1,000	-0,562	-0,645	-0,525	-0,582	-0,658	-0,570
PF_PA		0,246	0,167	0,285	0,226	0,156	0,238
	-0,562	1,000	0,986	0,995	0,979	0,992	0,993
PF_PR				<			<
	0,246		0,000	0,0001	0,001	0,000	0,0001
	-0,645	0,986	1,000	0,987	0,993	0,994	0,993
PS_PA					<	<	<
	0,167	0,000		0,000	0,0001	0,0001	0,0001
	-0,525	0,995	0,987	1,000	0,989	0,984	0,995
PS_PR		<					<
	0,285	0,0001	0,003		0,000	0,000	0,0001
	-0,592	0,979	0,993	0,989	1,000	0,978	0,994
ALT			<				<
	0,226	0,001	0,0001	0,000		0,001	0,0001
	-0,658	0,992	0,994	0,984	0,978	1,000	0,988
DIAM		0,156	0,000	<0,0001	0,000	0,001	0,000
	-0,570	0,993	0,995	0,995	0,994	0,988	1,000
		<	<	<	<	<	
	0,238	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,000

Nota: El valor superior es el coeficiente de correlación observado, y el segundo es la probabilidad de error en la prueba estadístico con hipótesis $\rho=0$

Tabla: 1º Análisis foliar (04/04/07)

Tratamientos	Nutrientes			
	N (%)	P (%)	K (%)	B (ppm)
T0	1,18	0,24	0,71	56
T1	1,52	0,3	0,62	53
T2	3,1	0,27	0,58	72
T3	1,39	0,26	0,65	51
T4	3,03	0,31	0,73	67
T5	1,21	0,2	0,62	54

Tabla: 2º Análisis foliar (07/06/07)

Tratamientos	Nutrientes			
	N (%)	P (%)	K (%)	B (ppm)
T0	1,88	0,37	0,97	19
T1	1,6	0,29	0,89	18
T2	2,69	0,33	0,96	22
T3	1,67	0,33	0,97	14
T4	2,77	0,28	1,02	16
T5	1.81	0.35	1.04	18

Cuadro: Comparación de fertilización entre dosis aplicada por Añón et al y dosis aplicada en este ensayo

Etapas	Fertilizante a usar	Grs/plantín
Starter	SuperP de Ca	
Arranque	NPK (2:3:2) Fosfato de amonio 18:44	0.25
Cría	NPK (3:2:2), Fosfato de amonio + NO_3NH_4	0.28
Terminación	NPK (2:3:5)	0.17

Etapas	Fertilizante	T 0 (g/pl)	T1
Arranque	18-44-0	0.01	0.01

	13-0-46	0.006	0.006
Cría	18-18-18	0.015	0.015
	34-0-0	0.004	0.004
		0.015	0.015
	18-18-18	0.0035	0.0035
	13-0-46	0.0035	0.0035
	15.5-0-0+Ca		
Terminación	11/09/1935	0.013	0.013
	0 - 52 - 34	0.009	0.009