

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EFECTO DE *Trichoderma harzianum* cepa L1 SOBRE LA CALIDAD DE  
PLANTINES EN *Pinus taeda***

**por**

**Santiago DONATI**

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

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2011**

Tesis aprobada por:

Director: -----  
Ing. Agr. Graciela Romero

-----  
Lic. Jorge Pereira

-----  
Ing. Agr. Maricarmen Rosas

Fecha: -----  
16 / 12 / 2011

Autor: -----  
Santiago Andrés Donati Linaro

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo contó con el apoyo de diferentes personas, que en forma anónima hicieron posible la realización del mismo. Quisiera agradecer a los docentes de la Facultad de Agronomía Ing. Agr. Graciela Romero y Lic. Jorge Pereira, del Departamento de Protección Vegetal y Biología Vegetal, respectivamente; a la Ing. Agr. Maricarmen Rosas en nombre del vivero *Buena Unión* por abrirme las puertas del mencionado vivero; a la Ing. Agr. Claudine Folch en nombre de la empresa LAGE y Cía. S.A. y finalmente a Danila Balbi del Departamento de Producción Forestal y Tecnología de la Madera.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
1 <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 CONCEPTOS PRELIMINARES .....	1
1.2 OBJETIVOS .....	3
1.2.1 <u>Objetivo general</u> .....	3
1.2.2 <u>Objetivos específicos</u> .....	3
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	5
2.1 IMPORTANCIA Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE PLANTÍN FORESTAL .....	5
2.1.1 <u>Concepto de calidad de plantín forestal y su importancia</u> .....	5
2.1.2 <u>Parámetros morfológicos que determinan la calidad de plantín</u> .....	6
2.1.2.1 Longitud de la parte aérea .....	7
2.1.2.2 Diámetro del cuello .....	9
2.1.2.3 Relación altura parte aérea / diámetro de cuello.....	9
2.1.2.4 Relación entre biomasa de la parte aérea y biomasa de la parte radicular .....	10
2.1.2.5 Biomasa.....	11
2.1.3 <u>Parámetros fisiológicos que determinan la calidad de plantín</u> .....	12
2.1.3.1 Contenido de humedad.....	13
2.1.3.2 Concentración de nutrientes .....	14
2.1.3.3 Concentración de carbohidratos .....	16
2.1.4 <u>Ejemplos sobre calidad de plantín en <i>Pinus taeda</i></u> .....	17
2.1.4.1 Padrones definidos por Carneiro .....	17
2.1.4.2 Padrones definidos por la empresa Weyerhaeuser .....	17
2.1.4.3 Padrones definidos por el Servicio Forestal (USDA) .....	18
2.2 <u>REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES EN <i>Pinus taeda</i></u> .....	19
2.2.1 <u>Padrones de referencia para la fertilización</u> .....	20
2.2.2 <u>Métodos de diagnóstico del estado nutricional en plantines</u> .....	21
2.2.2.1 Sintomatología foliar .....	22
2.2.2.2 Análisis de tejidos .....	24
2.3 <u>MARCADORES MOLECULARES COMO HERRAMIENTA DE         DIAGNOSTICO</u> .....	28
2.3.1 <u>Clasificación de los marcadores moleculares</u> .....	29

2.3.1.1	Marcadores proteicos .....	30
2.3.1.2	Marcadores de ADN .....	30
2.3.2	<u>Análisis isoenzimático</u> .....	33
2.3.3	<u>Uso de marcadores moleculares en forestación</u> .....	36
2.4	<b>CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES</b> .....	38
2.4.1	<u>El género <i>Trichoderma</i> spp.</u> .....	39
2.4.1.1	Clasificación taxonómica .....	40
2.4.2	<u>Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de <i>Trichoderma</i> spp.</u> .....	43
2.4.2.1	Disponibilidad de nutrientes .....	43
2.4.2.2	Temperatura .....	45
2.4.2.3	Humedad .....	46
2.4.2.4	pH .....	46
2.4.2.5	Oxígeno .....	47
2.4.3	<u>Mecanismos de acción directos de <i>Trichoderma</i> spp. como agente de biocontrol.</u> .....	47
2.4.3.1	Competencia .....	48
2.4.3.2	Micoparasitismo .....	49
2.4.3.3	Antibiosis .....	51
2.4.4	<u>Mecanismos de acción indirectos de <i>Trichoderma</i> spp. como agente de biocontrol.</u> .....	52
2.4.4.1	Efecto promotor del crecimiento en plantas .....	52
2.4.4.2	Solubilización de nutrientes minerales .....	53
2.4.4.3	Inducción de resistencia .....	55
2.4.4.4	Peroxidasas en la respuesta de defensa .....	60
3	<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	65
3.1	DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO .....	65
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	67
3.3	MUESTREO Y MEDICIONES .....	69
3.3.1	<u>Parámetros morfológicos en plantines</u> .....	69
3.3.2	<u>Parámetros fisiológicos en plantines</u> .....	70
3.3.3	<u>Análisis isoenzimático</u> .....	71
3.3.4	<u>Sobrevivencia de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa L1 en sustrato</u> .....	73
4	<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	75
4.1	DIÁMETRO ALTURA CUELLO .....	75
4.2	ALTURA PARTE AÉREA .....	76
4.3	PESO FRESCO .....	77
4.3.1	<u>Peso fresco tallo</u> .....	77
4.3.2	<u>Peso fresco raíz</u> .....	77
4.4	PESO SECO .....	78
4.4.1	<u>Peso seco tallo</u> .....	78

4.4.2	<u>Peso seco raíz</u> .....	78
4.5	ÍNDICES DE CALIDAD DE PLANTÍN DE <i>Pinus taeda</i> .....	78
4.6	SOBREVIVENCIA DE PLANTINES .....	81
4.7	ESTADO NUTRICIONAL .....	83
4.8	ANÁLISIS ISOENZIMÁTICO .....	86
4.9	SOBREVIVENCIA DE <i>Trichoderma</i> EN SUSTRATO .....	89
5	<u>CONCLUSIONES</u> .....	91
6	<u>RESUMEN</u> .....	93
7	<u>SUMMARY</u> .....	95
8	<u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	97
9	<u>ANEXOS</u> .....	105

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Principales parámetros morfológicos utilizados a la hora de evaluar la calidad de plantines forestales.....	8
2. Principales parámetros fisiológicos utilizados a la hora de evaluar la calidad de plantines forestales.....	13
3. Parámetros morfológicos que definen un plantín ideal de <i>Pinus taeda</i> según las especificaciones fijadas por la compañía Weyerhaeuser para sus plantaciones. ....	18
4. Niveles óptimos para los 12 elementos esenciales en soluciones de fertilizante líquido, para coníferas producidas en contenedor.....	21
5. Curva característica que muestra la relación entre el crecimiento de las plantas y los niveles de nutrientes en los tejidos de la misma. ....	25
6. Niveles óptimos de concentración de nutrientes para plantines en coníferas. ....	26
7. Estándares de nutrientes minerales para plantines de coníferas. ....	27
8. Resumen del programa de fertilización de los plantines durante el ciclo de producción en el vivero .....	67
9. Características de las muestras empleadas para la obtención de los homogeneizados de tejidos y corridas electroforéticas, según el No. de placa. ....	72
10. Resultados de las variables analizadas en plantines con y sin inocular con <i>Trichoderma harzianum</i> . ....	76
11. Principales índices que determinan el patrón de calidad de plantines de <i>Pinus taeda</i> para plantación. ....	79
12. Supervivencia de plantines a lo largo del ciclo productivo en vivero, según tratamiento. Entre paréntesis porcentaje de supervivencia con respecto al tiempo 1 de muestreo (100%). ....	82

13. Concentración foliar de los diferentes minerales correspondientes a las dos fechas de muestreo. ....	83
14. Concentración de <i>Trichoderma harzianum</i> en sustrato, según fecha de muestreo y tratamiento (expresadas en UFC/g sustrato). ....	89
Figura No.	
1. Características de un plantín de <i>Pinus taeda</i> (loblolly pine) con calidad óptima. ....	19
2. A – Cepa nativa de <i>Trichoderma harzianum</i> aislada de un escleroto de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> creciendo sobre medio de cultivo TSA. B – Hifas y conidióforos de <i>Trichoderma harzianum</i> (1cm = 20 µm). C – Esquema de conidióforo de <i>Trichoderma harzianum</i> . ....	41
3. Imagen tomada con microscopio electrónico de barrido donde se observa hifas de <i>Trichoderma</i> spp. enrolladas sobre una hifa de <i>Rhizoctonia</i> spp. (centro) durante el proceso de micoparasitismo. ....	51
4. Modelo para la vía de señalización de ISR en <i>Arabidopsis</i> , donde se muestra la relación entre los factores de transcripción NPR1, MYB72 y ELI3, las hormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) y la potenciación sistémica de la defensa. ....	59
5. Ensayo instalado en el interior del invernáculo. ....	65
6. Visualización de las bandas en las diferentes placas de corrida electroforética ....	87



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 CONCEPTOS PRELIMINARES

En el año 1987 con la aprobación de la Ley Forestal, el sector forestal comienza a tomar relevancia como rubro agrícola a nivel nacional. Desde la creación de dicha ley hasta la actualidad, el sector en su conjunto, ha sobrellevado una considerable transformación en sus diferentes etapas.

Una de las fases que mayores cambios experimentó dentro de la cadena forestal, fue la producción de plantines en viveros para establecimientos comerciales. La primera transformación significativa que vislumbraron los viveros, corresponde a un aumento considerable de la demanda de plantines de calidad, generada por el dinamismo que causó en el sector la creación de la mencionada Ley Forestal. En este punto comienza a haber una tendencia de utilizar solamente las especies comprendidas en dicha ley, por lo que la producción dentro del vivero se concentra solamente en unas pocas especies (*Pinus elliottii*, *Pinus taeda* y *Pinus pinaster*, para coníferas).

Las técnicas de producción de las especies de coníferas experimentan un cambio radical, de la mano de la incorporación de paquetes tecnológicos importados desde el exterior. En un principio se producían plantines a raíz desnuda con poca manipulación de los mismos; se sembraban las semillas directamente en el suelo (previamente acondicionado) para la formación de almácigos en canteros. Posteriormente se pasa a producir plantines en contenedor con intervenciones prácticamente diarias; utilizando sustratos estériles, bajo la protección de invernáculos con complejos sistemas de riego y fertilización. Con la demanda creciente de plantines cada vez de mejor calidad, se observa una transición en los tipos de viveros existentes; se registra una concentración de la producción en unos pocos viveros de gran capacidad productiva (muchos de ellos pertenecientes a las propias empresas con plantaciones), desapareciendo un gran número de ellos, probablemente por no poder hacer frente a la inversiones necesarias para incorporar las nuevas tecnologías disponibles en país.

En lo que respecta al cuidado de la sanidad de los plantines, también se observan cambios importantes. Muchos de los pesticidas que en el pasado se aplicaban para el control de las enfermedades, en tiempos actuales su uso está prohibido en el país, o presentan importantes restricciones en su aplicación por organismos de certificación. Con el aumento de la superficie de plantaciones,

cada vez más aparecen nuevas plagas y enfermedades que antes no estaban registradas en el país.

El control de las enfermedades pasa a enmarcarse dentro del contexto de Manejo Integrado de Plagas. En una aproximación al Manejo Integrado de Plagas, se define como aquellas prácticas tendientes a la protección de los cultivos, que son ambientalmente apropiadas, socialmente benéficas y económicamente viables. Según Boller et al. (2004), el Manejo Integrado de Plagas se aplica a enfermedades, plagas y malezas. Dentro del contexto de la agricultura sustentable, en la protección de los cultivos se coloca el énfasis en las medidas preventivas (control indirecto), que deben ser utilizadas en mayor orden, antes que las medidas curativas (control directo). El control consiste en la gestión de las poblaciones de la plaga para mantenerlas por debajo del nivel que causa pérdidas económicas. Las decisiones acerca de la necesidad de aplicar medidas de control deben contar con las herramientas más avanzadas, tales como los métodos de pronóstico y umbrales económicos científicamente comprobados. Los instrumentos de protección directos de los cultivos son el último recurso, y se deben aplicar en caso de que ocurran pérdidas económicamente inaceptables, y no se puedan prevenir por medios indirectos.

De esta manera, se deja de lado la necesidad de aplicación de grandes cantidades de pesticidas, de gran toxicidad para el medio ambiente y trabajador rural. Hay una menor dependencia del control químico de las enfermedades, basado en el uso indiscriminado de pesticidas, con aplicaciones sistemáticas sin ningún criterio biológico; empleando productos de amplio espectro, con un número muy reducido de principios activos y con un tiempo prolongado de persistencia en el medio.

Enmarcado en el al Manejo Integrado de Plagas, surge un gran interés por parte de los viveristas forestales en incorporar como herramienta el Control Biológico de enfermedades, como una herramienta alternativa al uso de pesticidas químicos; ya que su uso no representa un impacto ambiental negativo para el ambiente ni para los seres humanos. Cook y Beker (1984) definen al Control Biológico como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o un parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedero o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas.

En el contexto del Control Biológico de enfermedades, el género de hongos *Trichoderma* aparece como un potencial agente de control biológico, debido a su capacidad saprófita competitiva y a su habilidad de parasitar un amplio espectro de hongos fitopatógenos. Varios estudios han demostrado los

diferentes mecanismos de acción que presenta *Trichoderma* como agente de biocontrol, entre los que se incluye la competencia por factores esenciales, micoparasitismo, antibiosis, efecto promotor del crecimiento vegetal, inducción de resistencia a enfermedades en plantas, así como la solubilización de nutrientes.

En este trabajo lo que se busca evaluar es el efecto que presenta *Trichoderma harzianum* cepa L1, sobre la calidad de plantines de *Pinus taeda* producidos en un vivero forestal ubicado en el departamento de Rivera. La calidad de los plantines producidos se evalúa a través de diferentes parámetros propuestos para la especie. De esta manera se analiza el efecto de *Trichoderma* sobre el crecimiento de los plantines, así como en la inducción de resistencia a enfermedades y estado nutricional de los mismos.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo general**

El objetivo del presente trabajo es evaluar la conveniencia de incluir un fungicida biológico disponible en el mercado local, dentro de un esquema de producción de plantines de *Pinus taeda* en vivero forestal.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar al antagonista *Trichoderma harzianum* cepa L1 como posible agente de control biológico, frente a enfermedades desarrolladas en vivero forestal de la especie *Pinus taeda*.
2. Evaluar y cuantificar a *Trichoderma harzianum* cepa L1 como posible biopromotor de crecimiento en plantines de *Pinus taeda* producidos en un vivero forestal, en función de los parámetros de calidad de plantín estipulados para la especie.
3. Determinar mediante análisis isoenzimático, el efecto de *Trichoderma harzianum* cepa L1 como posible inductor de resistencia frente a fitopatógenos, sobre plantines de *Pinus taeda* producidos en vivero forestal.

4. Evaluar y cuantificar la supervivencia y colonización de *Trichoderma harzianum* cepa L1 incorporado al sustrato de producción de *Pinus taeda*, durante todo el ciclo de producción en un vivero forestal.

## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 IMPORTANCIA Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE PLANTÍN FORESTAL**

#### **2.1.1 Concepto de calidad de plantín forestal y su importancia**

El establecimiento exitoso de una plantación, es el principal objetivo de un proyecto de inversión forestal, el cual depende de numerosos factores, entre los que se destacan: la preparación previa del terreno, la técnica de plantación, los cuidados posteriores a ésta y la calidad de planta (Villar 2003, García 2007).

Duryea, citado por Villar (2003) define a un plantín de calidad como aquel que es capaz de alcanzar un desarrollo (supervivencia y crecimiento) óptimo en un medio determinado y, por tanto, cumplir los objetivos establecidos en un plan de repoblación. De manera similar, Cuevas, citado por Cópola et al. (2000) lo define como aquel que sobrevive a un estrés ambiental prolongado y produce un vigoroso crecimiento posterior a la plantación. Johnson y Cline, citados por Sigala (2009) introducen el aspecto económico en la definición y caracterizan al plantín de calidad como aquel producido al menor costo posible en función de su objetivo, además de tener la capacidad de sobrevivir y crecer adecuadamente después de ser plantado.

El modelo de calidad ideal de una planta no es constante y se modifica según la especie utilizada, el sitio a forestar, los objetivos de la reforestación, el estado fenológico de la planta y la edad de la misma (Carneiro 1995, Villar 2003).

Carneiro, citado por Carneiro (1995) determina que los criterios para la clasificación de calidad de plantín, se basan en dos criterios fundamentales: el aumento del porcentaje de supervivencia de plantines después de la repoblación, y la disminución de la frecuencia de labores culturales de mantenimiento del sitio recién implantado.

Cuando la supervivencia de los plantines no alcanza niveles aceptables, la reposición de los individuos muertos se hace necesaria, aumentando significativamente el costo de los proyectos (Carneiro 1995, Villar 2003). También el crecimiento inicial deficiente de los plantines, obliga a implementar la necesidad de limpieza del sitio, aumentando los costos de mantenimiento posplantación (Carneiro 1995, García 2006). Esta escasez en el crecimiento,

genera que las plantas presenten una menor tasa de crecimiento por superficie al año, aumentando el tiempo de ejecución del proyecto; igualmente se genera una tendencia a la falta de uniformidad del producto final, debido a la calidad del fuste (Carneiro, 1995).

Utilizar plantines de calidad ideal para las circunstancias planteadas, tiene una repercusión directa sobre el aumento de la supervivencia y reducción de mantenimiento, en la repoblación. Carneiro (1995), Villar (2003) constatan la relación directa entre la calidad de los plantines utilizados en la reforestación, y la calidad del producto final obtenido de la misma. El utilizar plantines de buena calidad condiciona al reforestador, que el fracaso de una reforestación no es debido a la calidad del plantín sino a otros factores. A su vez, un vivero al producir un producto de calidad, se estaría asegurando futuras ventas, así como un sobreprecio debido a la calidad del producto vendido (Villar 2003, García 2006).

En la actualidad existen dos tendencias sobre en que etapa debe ser evaluada la calidad de los plantines; por un lado se plantea que la misma sea evaluada a campo, acorde al desempeño posterior a la reforestación; por otro lado, existe la tendencia a que la calidad sea evaluada aún en etapa de vivero. Esta segunda tendencia se debe a que la calidad de los plantines se ve modificada, según las técnicas de producción, así como el transporte, modo de replantación, etc. (Brissette, citado por Carneiro, 1995). Carneiro (1995), Cópola et al. (2000) hacen una revisión detallada sobre éstas prácticas culturales que afectan la calidad de los plantines producidos.

Villar (2003) considera que la calidad de un plantín forestal es la resultante de la interacción de cuatro componentes: la calidad genética, el estado sanitario, la morfología y la fisiología. Dado que la calidad morfológica y fisiológica de una planta depende, en gran medida, de sus características genéticas; en este trabajo se hará énfasis en aquellos caracteres morfológicos y fisiológicos que condicionan el establecimiento y desarrollo de las plantaciones.

### **2.1.2 Parámetros morfológicos que determinan la calidad de plantín**

La morfología de un plantín es la manifestación de la respuesta fisiológica del mismo a las condiciones ambientales y a las prácticas culturales realizadas dentro del vivero (Birchler et al., 1998). Villar (2003) hace referencia a los atributos morfológicos que determinan la calidad de plantín como, un conjunto de caracteres tanto de naturaleza cualitativa (presencia de daños o heridas, deformaciones radicales, tallos múltiple, etc.) como cuantitativa (tamaño de plantín o alguna de sus partes y la proporción entre ellas) sobre la

forma y estructura de la planta o alguna de sus partes. La mayoría de estos parámetros se pueden cuantificar a simple vista o con mediciones sencillas; además, el número de probables parámetros a estudiar es elevado y algunos de ellos están muy correlacionados, por lo que se deben elegir aquéllos que proporcionen una mayor información respecto a la calidad de los plantines y sean de medición sencilla, rápida, accesible y económica (Birchler et al. 1998, Villar 2003).

El cuadro 1 muestra los principales parámetros morfológicos utilizados en algunos trabajos (Schmidt-Vogt, citado por Carneiro 1995, Villar 2003, Alía et al. 2005) para evaluar la calidad de diferentes plantines forestales.

### **2.1.2.1 Longitud de la parte aérea**

Sin dudas éste parámetro es el que presenta mayor facilidad a la hora de ser determinado, pero por sí solo carece de valor para evaluar la calidad de plantines, ya que ofrece sólo una somera aproximación del área fotosintetizadora y transpirante, e ignora la arquitectura del tallo. Sin embargo si se relaciona a éste con otros parámetros, puede llegar a adquirir relevancia como indicador de calidad de plantín (Cóppola et al. 2000, Sigala 2009).

Carneiro (1995) hace una intensa revisión sobre trabajos que estudian la altura de plantín forestal (incluyendo a *Pinus taeda*) y en ellos hay consenso sobre que, los plantines que presentan mayores alturas en la parte aérea, se observa una disminución en el porcentaje de sobrevivencia a campo en los primeros estados de crecimiento. Contrariamente, los plantines de menor altura presentan mayores porcentajes de sobrevivencia.

También se concluye la existencia de una correlación positiva entre la dimensión de los plantines y la tasa de crecimiento de éstos, una vez que se han establecido; llegando las plantas a una mayor altura años posteriores a la plantación. Estos resultados concuerdan con los trabajos que también citan diferentes autores, como ser Birchler et al. (1998), Villar (2003), Sigala (2009).

A la hora de seleccionar la altura final que tendrá un plantín, se debe tener presente que aquellos que presentan una altura superior a la establecida para plantines de calidad óptima, son más susceptibles al vuelco por efecto del viento, presentan mayores tasas de transpiración, pero incrementan considerablemente su ritmo de crecimiento debido a una mayor superficie fotosintetizadora. Por su lado, los que presenten una altura deficiente van a mostrar una menor capacidad de competencia con la vegetación circundante y un mayor riesgo por daños a pisoteo (Villar, 2003).

**Cuadro No. 1:** Principales parámetros morfológicos utilizados a la hora de evaluar la calidad de plantines forestales.

<b>PARÁMETROS MORFOLÓGICOS</b>	
Cualitativos	Plantines con heridas no cicatrizadas
	Plantines parcialmente o totalmente desecados
	Tallos con fuertes curvaturas
	Tallos múltiples
	Tallos con muchas guías
	Tallos y ramas incompletamente maduros
	Tallos desprovistos de una yema terminal sana
	Tallos y ramas con parada vegetativa incompleta
	Inexistencia de ramificaciones o claramente insuficiente
	Formación de acículas
	Acículas recientes fuertemente dañadas
	Cuello de raíz dañado
	Raíces principales gravemente enrolladas, torcidas o dañadas
	Raíces secundarias ausentes o dañadas
	Plantines que presentan daños causados por organismos
	Sistema radicular claramente insuficiente
Cuantitativos	Altura de parte aérea
	Peso total de plantín
	Relación peso total de plantín / altura de parte aérea
	Peso de la parte aérea
	Relación peso de la parte aérea / altura de parte aérea
	Diámetro del cuello
	Relación diámetro de cuello / altura de parte aérea
	Relación peso parte aérea / peso parte radicular
	Relación largo parte aérea / largo parte radicular
	Peso del sistema radicular
	Relación peso del sistema radicular / altura de la parte aérea
	Largo de raíces
	Superficie activa de raíces
	Frecuencia de micorrizas en raíces
	Porcentaje de raíces
	Largo de acículas
Cantidad y largo de yemas	



### **2.1.2.2 Diámetro del cuello**

Es un parámetro también de fácil medición, siendo el más importante en la utilización como criterio de evaluación de calidad en plantines. El diámetro de cuello da una aproximación de la sección transversal de transporte de agua, del tamaño del sistema radicular, de la resistencia mecánica y de la capacidad relativa para tolerar altas temperaturas en la superficie del suelo (Cleary y Greaves, citados por Birchler et al., 1998). Plantines con diámetro de cuello mayor, soportan mejor los daños causados por animales e insectos, y muestran mayor resistencia al doblamiento (Cóppola et al. 2000, Sigala 2009).

Al igual que el parámetro anterior, Carneiro (1995) hace una intensa revisión de trabajos sobre el tema y concluye que hay una fuerte correlación positiva entre la sobrevivencia a campo de los plantines y su diámetro de cuello al momento de ser plantados. Esta misma relación se observa entre el diámetro del cuello y los incrementos iniciales de los mismos, pero esa superioridad de ve disminuida al utilizar plantines de gran altura en la parte aérea.

### **2.1.2.3 Relación altura parte aérea / diámetro de cuello**

Este parámetro se conoce con el nombre de índice de esbeltez o robustez, y se define como la relación entre la altura de la parte aérea (medida en cm) y el diámetro de cuello (medido en mm).

$$\text{Índice de esbeltez} = \frac{\text{Altura parte aérea (cm)}}{\text{Diámetro cuello (mm)}}$$

Un índice de robustez con valores bajos esta asociado a mejor calidad de plantín, ya que éste es más robusto; en cambio, valores altos indican que el plantín es más esbelto y que existe desproporción entre la altura de la parte aérea y el diámetro de cuello (Sigala, 2009). Debido a esto, los plantines que presentan índices de esbeltez intermedios muestran los mayores crecimientos en campo, mientras tanto, los plantines achaparrados como los muy ahilados (índices de esbeltez bajos y altos, respectivamente) presentan un menor desarrollo (Villar, 2003).

Este parámetro de calidad toma relevancia cuando los plantines son producidos en contenedor, donde la cantidad de éstos por superficie a veces no es la más adecuada. Normalmente existe una buena correlación entre la altura y la masa de la parte aérea, pudiendo existir situaciones en que un plantín sea alto pero su parte aérea no sea grande. Esta situación ocurre cuando los plantines con producidos a densidades altas o a la sombra. Como consecuencia

de esto, las partes aéreas se elongan mucho pero se ramifican poco, los tallos son delgados y, en términos relativos, suelen poseer menos follaje. Por ello, a la hora de evaluar la calidad de plantines, conviene que se referencie su altura de la parte aérea, con el diámetro de cuello (Villar, 2003).

#### **2.1.2.4 Relación entre biomasa de la parte aérea y biomasa de la parte radicular**

Es un parámetro utilizado para determinar el balance entre el área de transpiración y el área de absorción de agua. Para determinar el cociente, se utilizan los pesos secos de ambas partes (Birchler et al. 1998, Cópola et al. 2000, Sigala 2009). Para establecer el peso seco de parte aérea o raíz, Cópola et al. (2000) proponen que los plantines sean secados a estufa a una temperatura de 65° a 70° C durante 48 horas; mientras que Carneiro (1995) plantea que ésta determinación se realice a una temperatura de 105° C, hasta peso constante, lo que ocurre usualmente antes de las 24 horas.

Dicho parámetro también sirve para comparar las tasas de crecimiento de la parte aérea y de la raíz ya que es una medida dinámica de distribución de carbono dentro del plantín (Johnson y Cline, citados por Sigala, 2009).

Los plantines que presenten un cociente menor de parte aérea y parte radicular pueden conservar un mejor estado hídrico, con un consumo más moderado de agua en situaciones de deficiencia hídrica; de lo contrario pueden mermar su desarrollo en el campo debido al deterioro de dicho balance (Villar, 2003).

Por su cuenta, plantines con cocientes muy bajo, tienen menor capacidad de crecimiento y supervivencia, debido al deterioro de su balance de carbono, especialmente bajo condiciones de estrés. Un excesivo desarrollo de tejidos no fotosintéticos (raíces) implica que las fosas de carbono sean mayores, y por lo tanto, menor la disponibilidad de carbohidratos para la elongación de los tallos y las raíces (Villar, 2003).

Olivo y Buduba (2006) utilizan en la evaluación de calidad de plantines de *Pinus ponderosa* el Índice Tallo Raíz de Iverson, calculado como la relación de pesos secos entre el tallo y la raíz. Iverson, citado por Olivo y Buduba (2006) señala valores entre 1,5 y 2 como óptimos para su índice, variando éstos de acuerdo a la especie analizada.

$$\text{Índice tallo raíz} = \frac{\text{Peso seco tallo (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}$$

De la combinación de los dos últimos parámetros (altura / diámetro y biomasa tallo / biomasa raíz), surge el Índice de Calidad de Dickson (ÍCD), propuesto por Dickson et al., citados por Carneiro (1995). Éste índice se calcula mediante la relación entre el peso seco total del plantín (g) y la suma de la esbeltez y la relación parte aérea / parte radicular. Dickson et al., citados por Carneiro (1995) consideran que cuanto más alto es el valor de su índice (ÍCD), mejor es la calidad del plantín.

$$\text{ÍCD} = \frac{\text{Peso seco plantín (g)}}{\left( \frac{\text{Altura parte aérea (cm)}}{\text{Diámetro cuello (mm)}} \right) + \left( \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}} \right)}$$

Otro índice de evaluación que surge de la combinación de los factores mencionados, es el Índice de Lignificación propuesto por Prieto et al. (2004). El Índice de Lignificación consiste en determinar el porcentaje de peso seco, con relación al contenido de agua en los plantines, lo cual expresa el nivel de precondicionamiento de las plantas y se obtiene al dividir el peso seco entre el peso fresco, multiplicado por cien.

$$\text{Índice de lignificación} = \left( \frac{\text{Peso seco plantín (g)}}{\text{Peso verde plantín (g)}} \right) \times 100$$

Una disminución del suministro de agua a los plantines induce estrés hídrico, lo cual contribuye a reducir el crecimiento en altura, promover la aparición de la yema apical (dormición invernal en coníferas) e iniciar mecanismos de resistencia a sequías y bajas temperaturas (Prieto et al., 2004). Por lo tanto, cuanto mayor sea el estrés hídrico, mayor va a ser el mencionado índice. Éste toma relevancia en la última fase de producción de los plantines dentro del vivero, cuando lo que se busca es el endurecimiento de los mismos, preparando a los plantines para que sufran el menor estrés posible durante el transporte a campo y una vez plantados. Este etapa de rusticación se vincula directamente con el proceso de lignificación de los tejidos; o sea con el índice en cuestión.

### **2.1.2.5 Biomasa**

Sobre este parámetro, Carneiro (1995) hace una revisión de diferentes trabajos, llegando a la conclusión de que el peso de los plantines (cantidad de biomasa) presenta una gran correlación positiva con la sobrevivencia a campo de los mismos. Es así que un plantín de calidad debe ser lo más pesado posible, para que tenga la mejor eficiencia fisiológica y un mayor crecimiento,

siempre y cuando presente buen balance entre la parte aérea y la raíz, de manera que no se afecte su supervivencia (Thompson, citado por Sigala, 2009).

Existen varias formas de combinar en un mismo índice la biomasa de un plantín, tanto los pesos de las diferentes partes del mismo (parte aérea y raíz) como la forma de expresarlos (peso verde o peso seco). Carneiro (1995) define a una de éstas combinaciones como el Porcentaje de Raíz, determinado como el porcentaje en peso seco de las raíces, sobre el peso seco total del plantín.

$$\text{Porcentaje de Raíces} = \frac{\text{Peso seco sistema radicular (g)}}{\text{Peso seco plantín (g)}}$$

### **2.1.3 Parámetros fisiológicos que determinan la calidad de plantín**

Los parámetros fisiológicos de un plantín, comprenden los aspectos internos de éstos, y se relacionan directamente con su comportamiento a campo en el mediano y largo plazo después de su plantación (Cóppola et al. 2000, García 2007).

Carneiro (2005) evidencia que la calidad fisiológica de los plantines puede ser más importante que los efectos de orden morfológico; pero dado la complejidad a la hora de ser evaluados, muchos trabajos sobre calidad de plantines forestales omiten el estudio de estos parámetros, aunque se sepa la gran importancia que este tema presenta.

Sumado a esta dificultad, el estudio de los parámetros fisiológicos se refiere al estado del plantín en el momento puntual de realizar la medición y su validez no se extiende más allá de las cuatro semanas, debido a que cambian rápidamente en el corto plazo (García, 2007).

Algunos de los parámetros fisiológicos más utilizados que aparecen en la bibliografía se presentan en el siguiente cuadro (Carneiro 1995, Cóppola et al. 2000, Villar 2003, García 2007).

**Cuadro No. 2:** Principales parámetros fisiológicos utilizados a la hora de evaluar la calidad de plantines forestales.

<b>PARÁMETROS FISIOLÓGICOS</b>
Contenido de humedad
Concentración de nutrientes
Concentración de carbohidratos
Letargo de yemas terminales
Liberación de electrolitos en raíces finas
Termografía foliar por infrarrojos
Potencial de formación de nuevas raíces
Prueba de vigor
Resistencia a las heladas
Conductancia estomática y tasa de fotosíntesis
Emisión de compuestos volátiles inducidos por estrés
Concentración de clorofilas

### **2.1.3.1 Contenido de humedad**

El agua es considerada como uno de los principales factores limitantes del crecimiento en los sistemas de producción de plantines en contenedor bajo invernáculo. Ésta importancia del agua se debe a que cualquier proceso fisiológico del plantín, está directa o indirectamente afectado por el agua (Landis, 1989).

Dentro de estos procesos fisiológicos, el agua afecta en primera instancia la germinación de las semillas, pero también incide en la división celular de las plantas y su déficit provoca acumulación de solutos y hormonas que retrasan su crecimiento; afecta el movimiento de las células guardas de los estomas (regulando el balance hídrico de los plantines), también regula la fotosíntesis y la resistencia a la difusión de las acículas (Carneiro 1995, Sigala 2009). Asimismo se ha observado una correlación positiva entre valores de éste parámetro con los parámetros morfológicos, como ser diámetro de cuello, altura parte aérea y relación altura / diámetro de cuello (Carneiro 1995, Cópola et al. 2000). Sí ocurre un déficit prolongado de humedad durante el ciclo productivo de los plantines, su crecimiento y vigor serán menores, y en consecuencia la mortalidad en campo será mayor (Sigala, 2009).

El estado del agua en las plantines puede ser descrito de tres formas distintas: contenido de humedad, potencial hídrico y movimiento del agua; siendo el potencial hídrico ( $\psi$ ) el indicador de mayor utilización. Éste es definido como la energía necesaria para generar el movimiento del agua dentro del plantín (Landis, 1989).

Según Landis (1989), se recomienda que durante el ciclo productivo de los plantines el potencial hídrico ( $\psi$ ) de éstos, varíe en función de las diferentes etapas de producción. Para lograr dicha variación, el viverista adapta los diferentes regímenes de riego, según la fase de producción que se encuentre.

Durante la primera etapa, correspondiente al establecimiento, los riegos deben ser frecuentes y de bajo caudal para lograr que la capa superficial de sustrato (lugar de siembra) esté saturada y favorecer la germinación de las semillas.<sup>1</sup> Un riego deficitario puede causar una disminución en el porcentaje de germinación por muerte de semillas, y un excesivo riego, favorecer las condiciones para la aparición de enfermedades del complejo *Damipg-off* de pre-emergencia (Landis, 1989).

La segunda etapa, correspondiente a la de crecimiento rápido, los sucesivos riegos deben ser esparcidos en el tiempo y de alto caudal. De esta manera se logran períodos regulares con ligero déficit hídrico (bajos  $\psi$ ) que resultan en un crecimiento más robusto de los plantines.<sup>1</sup>

Por último, en la tercera etapa que corresponde a la de endurecimiento, el riego se retiene durante períodos cortos de tiempo, hasta que los plantines comiencen a mostrar marchitez, logrando de esta manera los efectos de endurecimiento vistos en esta sección y en la 2.1.2.4.

### **2.1.3.2 Concentración de nutrientes**

Landis (1989) reconoce que del total de elementos existentes, tan solo 15 son esenciales para el crecimiento de las coníferas. El carbono, hidrógeno y oxígeno son obtenidos a partir del agua y del dióxido de carbono atmosférico, y en total estos tres elementos, representan el 96% de la materia seca de la planta (Sigala, 2009). Los restantes 13 elementos son de origen mineral y son absorbidos como iones del suelo o sustrato; éstos se dividen en macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre) y micronutrientes (hierro, manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno). En la lista

---

<sup>1</sup> Hayashi, R. 2010. Riego en vivero. In: Curso Producción Intensiva de Plantines de Eucaliptus y Pino (2010, Montevideo). Textos. Montevideo, Facultad de Agronomía. 45 p. (sin publicar).

de micronutrientes se excluye el cloro al no ser elemental para las coníferas, pero sí para otras plantas.

Cada especie producida dentro del vivero, presenta requerimientos particulares de los mencionados elementos esenciales (nutrientes), que permitirán un crecimiento y vigor óptimos. Estos requerimientos no son constantes para cada especie, sino que varían según las diferentes etapas de desarrollo de los plantines. Si estos nutrientes necesarios no están disponibles cuando los plantines los necesiten (en cantidades y proporciones adecuadas), el crecimiento y la productividad de éstos se verán afectados negativamente (Birchler et al., 1998). También puede suceder que los niveles de nutrientes se encuentren en exceso, con respecto a los requerimientos de los plantines, lo que genera una disminución en su crecimiento o incluso llegar a la muerte por toxicidad.

El primer resultado de la deficiencia de nutrientes es la reducción en el crecimiento del plantín, disminuyendo la productividad aún sin presentarse síntomas visibles; si esta condición persiste, pueden aparecer síntomas visibles de deficiencia y reducirse aún más el crecimiento. Otra particularidad de una deficiencia de nutrientes, es que se pueden proporcionar las condiciones para generar una calidad inferior de plantines, predisponiéndolos al ataque de enfermedades (Carneiro 1995, García 2007).

Se ha observado que los plantines con buen estado nutricional presentan mejores condiciones para soportar el estrés generado durante la plantación, lo que repercute directamente en una correlación positiva entre la concentración de nutrientes en acículas y la supervivencia y crecimiento de los plantines en el campo (Carneiro, 1995).

Esta condición de superioridad de los plantines está relacionada con ciertos factores fisiológicos afectados por el estado nutricional de los mismos, como la capacidad de crecimiento radicular, la resistencia a sequías y la resistencia a heladas. En lo que respecta al sistema radicular, los plantines producidos con niveles óptimos de nutrientes presentan un adecuado desarrollo y buena formación del mismo (Carneiro, 1995). Bajo condiciones de estrés hídrico, la concentración de potasio en los tejidos puede condicionar la supervivencia de los plantines a campo, debido a la función de este mineral en los ajustes osmóticos y a una reducción de la tasa de transpiración (Villar, 2003). Por último, se ha visto una influencia positiva de la concentración de boro en acículas, con respecto a la resistencia a las heladas que presentan los plantines en el campo (Carneiro 1995, Cópola et al. 2000).

Carneiro (1995) encuentra una estrecha relación entre el estado nutricional de los plantines y sus parámetros morfológicos. En este punto, sin dudas el nitrógeno es el mineral que presenta mayor influencia, dado que es el elemento mineral más abundante en los plantines. La supervivencia a campo y el tamaño de los plantines se correlaciona positivamente con el contenido de nitrógeno en acículas. Sin embargo, concentraciones de nitrógeno foliar muy elevadas generan plantines desbalanceados, con aumento en el crecimiento de la parte aérea en relación a las raíces; causando los efectos vistos anteriormente (Villar 2003, García 2007). Otro papel determinante del nitrógeno, es la relación directa que presenta con los procesos fisiológicos más importantes que ocurren en los plantines, como ser la fotosíntesis.

En la sección 2.2 se retoma nuevamente el tema relacionado a la nutrición mineral de los plantines, pero específicamente en lo que respecta a la producción de *Pinus taeda* dentro el vivero.

### **2.1.3.3 Concentración de carbohidratos**

Los carbohidratos presentes en un plantín se pueden dividir en tres grandes grupos: estructurales (celulosas y hemicelulosas), reservas (almidón) y azúcares solubles. Los correspondientes a los dos primeros grupos son carbohidratos de alto peso molecular, mientras que el tercer grupo corresponde a carbohidratos metabólicamente activos de pequeño peso molecular (Marshall, citado por Birchler et al. 1998, Villar 2000).

Desde el punto de vista de interés como atributo fisiológico, solamente toman relevancia los carbohidratos no estructurales (almidón y azúcares solubles). La cantidad y el estado de las reservas de estos carbohidratos en el plantín es un parámetro fisiológico que puede dar alguna indicación del vigor y comportamiento en el campo del mismo (Birchler et al., 1998).

Según Cóppola et al. (2000) los carbohidratos más importantes a la hora de evaluar la calidad fisiológica de un plantín son la sacarosa y el almidón. Durante períodos de elevadas tasas fotosintéticas, un porcentaje importante de carbohidratos producidos son almacenados en forma de almidones en hojas, tallos y raíces; el resto es consumido durante procesos de mantenimiento del metabolismo. Cuando ocurren períodos en donde las tasas fotosintéticas son reducidas, los almidones almacenados anteriormente se desdoblán para ser utilizados por el plantín para el proceso de respiración. Esta condición hace que durante el invierno donde la fotosíntesis se inhibe, o durante el período de estrés post-plantación, los plantines deban presentar una adecuada concentración de carbohidratos de reserva para que sean utilizados durante el



proceso de mantenimiento de la respiración de los plantines, hasta que ocurran las condiciones propicias de reanudar con elevadas tasas la fotosíntesis (Cóppola et al. 2000, Villar 2003, Sígala 2009).

#### **2.1.4 Ejemplos sobre calidad de plantín en *Pinus taeda***

##### **2.1.4.1 Padrones definidos por Carneiro**

Estudios realizados por Carneiro (1995) en el estado de Paraná en Brasil, demuestran que para la especie *Pinus taeda* sólo los plantines que presenten un diámetro de cuello mayor a 3,7 mm deberían ser llevados a campo para su plantación. Esta conclusión se basa en función del desempeño (sobrevivencia y crecimiento) que presentaron los plantines a los 15 meses de ser plantados. En este mismo trabajo se recomienda que la altura de la parte aérea de los plantines se sitúe entre los 20 y 30 cm; estableciéndose de esta manera, un rango mínimo y máximo para la relación altura parte aérea / diámetro de cuello de 5,4 y 8,1 respectivamente. Los valores mencionados son aplicables para cualquier fase del período de producción de los plantines.

En lo que tiene que ver con la relación peso seco aéreo / peso seco raíces, el mismo autor recomienda cocientes entre 2,12 y 2,87, para espaciamentos que van desde 2x2 hasta 10x10 respectivamente. Para este último cociente, estudios de Wakeley, citado por Carneiro (1995) obtienen resultados similares a los de Carneiro, con un intervalo del cociente entre 1 y 3. Finalmente Boyer y South, citados por Carneiro (1995) llegan a la conclusión de que, para sitios secos la máxima altura que deberían tener los plantines sea de 30 cm y con una relación peso seco aéreo / peso seco raíces menor a 2,5.

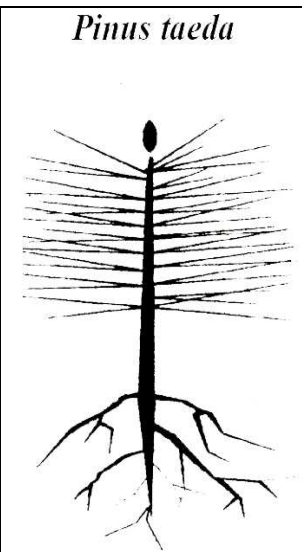
##### **2.1.4.2 Padrones definidos por la empresa Weyerhaeuser**

En la definición de plantín de calidad óptimo, Rose et al., citados por Birchler et al. (1998) (cuadro 3) incorporan nuevos parámetros a los definidos por Carneiro (1995). Dentro de estos, la altura de la parte aérea se establece como la deseable al rango dentro de los 20 y 25 cm. El diámetro del cuello mínimo que los plantines deben tener a la hora de ser expedidos por el vivero, queda definido a los 4 mm; estableciéndose la relación altura parte aérea / diámetro de cuello, de 5 y 6,25 como mínima y máxima respectivamente. También se define el volumen que debe ocupar el sistema radicular, siendo el valor mínimo aceptable de 3,5 cm<sup>3</sup>.

Dentro de la arquitectura que adopte el plantín se define la presencia de una yema terminal bien desarrollada y con parada invernal. Un tallo sin

bifurcaciones y dominante, que no presente ramificaciones de ningún tipo. Por último se define la arquitectura deseada que el sistema radicular debería adoptar, con una raíz principal bien desarrollada y de consistencia fibrosa, la que debe estar acompañada por un mínimo de 6 raíces laterales secundarias.

**Cuadro No. 3:** Parámetros morfológicos que definen un plantín ideal de *Pinus taeda* según las especificaciones fijadas por la compañía Weyerhaeuser para sus plantaciones.

	ALTURA AÉREA	20 – 25 cm
	YEMAS	Terminal bien desarrollada
	TALLO	Único y dominante
	RAMIFICACIONES	Ausentes
	DIÁMETRO CUELLO	> 4 mm
	SISTEMA RADICULAR	> 6 las laterales y de 1 <sup>er</sup> orden fibroso
	VOLUMEN RAÍZ	> 3,5 cm <sup>3</sup>

Fuente: Rose et al., citados por Birchler et al. (1998).

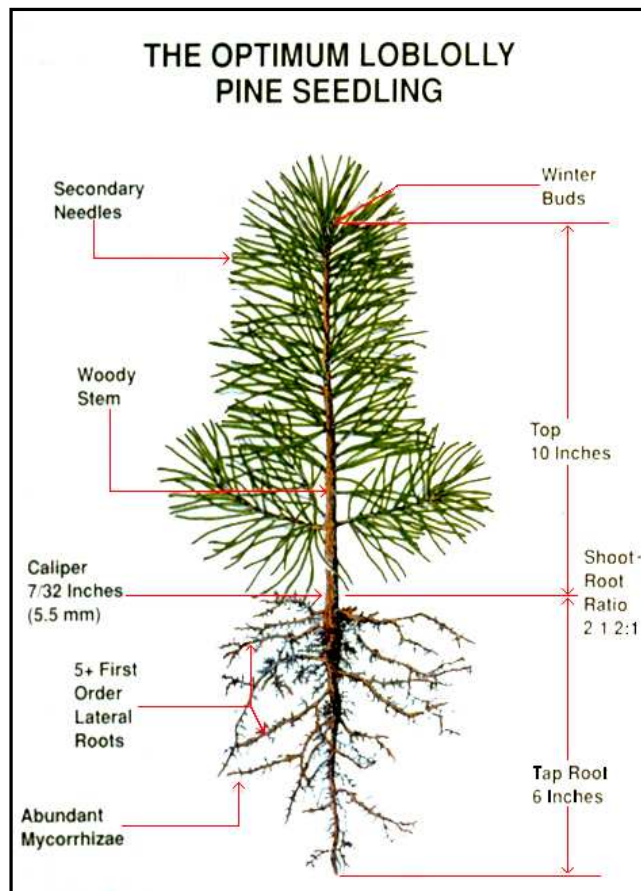
#### 2.1.4.3 Padrones definidos por el Servicio Forestal (USDA)

La figura 1 muestra los atributos que debería presentar un plantín de *Pinus taeda* para que sea considerado de calidad óptima, según la definición del Servicio Forestal de Estados Unidos. En ella se aprecia que se considera la presencia de una yema apical invernal bien desarrollada. La arquitectura del mismo se compone por un único tallo principal, el cual debería estar lignificado. Por su parte el sistema radicular debería estar conformado por una raíz principal, más 5 raíces secundarias como mínimo. Una novedad que no se presenta en ninguno de los dos sistemas de evaluación de calidad de plantines mencionados anteriormente, es la presencia de abundantes micorrizas asociadas al sistema radicular.

En lo que tiene que ver con las dimensiones en sí, se establece una altura de la parte aérea de 10 pulgadas (25,4 cm) con un diámetro de cuello de

7/32 pulgadas (5 mm). El largo de la raíz principal se establece en 6 pulgadas (15,24 cm); quedando definida de esta manera una relación tallo / raíz de 2 a 1.

**Figura No. 1:** Características de un plantín de *Pinus taeda* (loblolly pine) con calidad óptima (modificado de USDA. Forest Service, s.f.).



## 2.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES EN *Pinus taeda*

Durante la producción de plantines en contenedor, el sustrato utilizado no es capaz de aportar la cantidad de nutrientes minerales demandados por parte de los plantines; es así que la fertilización (al igual que el riego), se torna indispensable a la hora de producir plantines con crecimiento y calidad óptima.

Como se menciona anteriormente, cada una de las especies producidas requiere concentraciones particulares de nutrientes minerales, por lo que el programa de fertilización aplicado debe ser diseñado para mantener estas concentraciones específicas en el medio de crecimiento, manteniéndolas en balance entre los diferentes minerales, y también deber ser diseñado para permitir los cambios nutricionales necesarios durante las etapas del ciclo de producción (Landis, 1989). Un caso particular donde los ajustes de la fertilización no es planificada previamente, ocurre cuando suceden situaciones imprevistas donde lo que se busca es corregir dichas concentraciones mediante la refertilización.<sup>2</sup>

A la hora de desarrollar un programa de fertilización para el vivero, se debe tener presente las especies utilizadas (origen y procedencias), clima, etapas fisiológicas, sustrato y demás características del sistema de producción propias de cada vivero. Por tal motivo es fundamental identificar los efectos de la aplicación de diferentes nutrientes minerales, con el fin de determinar momentos y dosis óptimas de fertilización en cada etapa de producción (Añon et al., 2004).

Al no haber disponible en el país un programa de fertilización para plantines de *Pinus taeda*, cada vivero debe calibrar su propio programa en función de la regresión entre las diferentes dosis de nutrientes minerales aplicadas (minerales disponibles más que aplicados) y el rendimiento de la propia especie, teniendo en cuenta las especificaciones mencionadas anteriormente (Carneiro 1995, Añon et al. 2004).

### **2.2.1 Padrones de referencia para la fertilización**

Estudios realizados con plantines de *Pinus taeda* por South y Davey, citados por Carneiro (1995) recomiendan como nivel mínimo de fósforo (P) el correspondiente a 40 ppm, para el potasio (K) 90 ppm, calcio (Ca) 200 ppm, este último dato para sustratos de textura franco arenosa a arena franca, debiendo ser la saturación en base mayor a 40%; magnesio (Mg) 25 ppm para sustratos con más del 75% de arena, 35 ppm para sustratos franco arenosos y 40 ppm para sustratos francos y franco limosos, debiendo estar la saturación en base para el Mg en orden del 10 a 20%; azufre (S) 10 ppm y sodio intercambiable (Na) del sustrato no debería ser superior a 10 ppm.

Otros autores discriminan las diferentes dosis de aplicación, según la etapa del ciclo de producción. Tinus y McDonald, citados por Landis (1989)

---

<sup>2</sup> Zamalvide, J. P. 2010. Fertilización en viveros forestales; conceptos principales a manejar para la toma de decisiones. In: Curso Producción Intensiva de Plantines de Eucaliptus y Pino (2010, Montevideo). Textos. Montevideo, Facultad de Agronomía. 20 p. (sin publicar).

recomiendan los niveles óptimos presentados en el cuadro 4, para coníferas producidas en contenedor.

**Cuadro No. 4:** Niveles óptimos para los 12 elementos esenciales en soluciones de fertilizante líquido, para coníferas producidas en contenedor.

	Fase de establecimiento	Fase de crecimiento rápido	Fase de endurecimiento
<b>Macronutrientes (ppm)</b>			
N	50	150	50
P	100	60	60
K	100	150	150
Ca	80	80	80
Mg	40	40	40
S	60	60	60
<b>Micronutrientes (ppm)</b>			
Fe	4.00	4.00	4.00
Mn	0.80	0.80	0.80
Zn	0.32	0.32	0.32
Cu	0.15	0.15	0.15
Mo	0.02	0.02	0.02
B	0.50	0.50	0.50

Fuente: Tinus y McDonald, citados por Landis (1989).

En la primera etapa de producción los plantines necesitan alta disponibilidad de P, por lo que en las fertilizaciones se debe priorizar la aplicación del mismo. Especial atención merece el N, ya que es necesario aplicar pequeñas dosis, para evitar la formación de tejidos suculentos que favorezcan la predisposición al ataque de patógenos. Durante la segunda etapa el nutriente que toma mayor relevancia es el N, que es requerido en grandes cantidades por los plantines para mantener las altas tasas de crecimiento, sobre todo de la parte aérea. Finalmente, en la tercera etapa se debe aumentar la disponibilidad de K para favorecer la rustificación de los plantines; también es necesario disminuir la disponibilidad de N para detener el crecimiento de los mismos y lograr la rustificación mencionada (Añon et al., 2004).

### **2.2.2 Métodos de diagnóstico del estado nutricional en plantines**

La oferta en cantidad de nutrientes minerales del sustrato es tan variable, que incluso, puede ocurrir que los minerales se encuentren en forma no disponible para los plantines. Incluso cuando estos se encuentran bajo la

forma disponible, algunas condiciones, como baja aireación, CIC, textura del sustrato, régimen de riego y fertilización, pueden incidir en la absorción de los nutrientes. El pH, humedad del sustrato, ausencia de micorrizas e intensidad lumínica pueden afectar la absorción mineral. Todas estas variables hacen que la relación entre la concentración de minerales aplicadas durante la fertilización, y su utilización por parte de los plantines para realizar los diferentes procesos fisiológicos, no sean iguales (Carneiro, 1995).

Por este motivo, se torna indispensable para un vivero que produce plantines en contenedor, determinar el estado nutricional de los mismos, así como determinar el nivel de deficiencia y predecir su respuesta frente al agregado de determinada dosis de fertilizante. Landis (1989), Carneiro (1995) reconocen varias técnicas de diagnóstico frente a esta situación, siendo las más comunes para el país la sintomatología foliar y el análisis de tejidos.

#### **2.2.2.1 Sintomatología foliar**

La deficiencia de nutrientes minerales en plantines se caracteriza por presentar síntomas específicos y observables. Esta deficiencia se torna una herramienta válida para evaluar el estado nutricional de los plantines y además, presenta la ventaja de ser una técnica aplicable en el vivero sin depender de ningún laboratorio (Landis 1989, Barbazán 1998).

El diagnóstico de deficiencias de nutrientes abarca criterios que incluyen la apariencia de la parte aérea de los plantines (cambio de color, deformaciones, sanidad) y la evolución durante el transcurso de los síntomas (Carneiro, 1995).

Esta herramienta presenta algunas desventajas entre las que se incluye que, cuando se observa los síntomas de deficiencia de un mineral en particular, en los plantines ya ha ocurrido una seria deficiencia del mismo, pudiendo haber causado una marcada reducción del rendimiento. Puede ocurrir que un síntoma visual no sea característico de una deficiencia originada por un solo mineral sino de dos o más minerales. Algunos síntomas son menos característicos, ya que pueden estar asociados a un stress provocado por otros factores que afectan el crecimiento de los plantines (luz, agua, temperatura, pH); ciertas enfermedades y plagas pueden ocasionar síntomas visuales parecidos a deficiencias de nutrientes; el exceso de un nutriente puede originar deficiencia de otro, generando un desbalance nutricional (Carneiro 1995, Barbazán 1998).

Por las desventajas que presenta este método para evaluar el estado nutricional de los plantines, un correcto diagnóstico exige gran experiencia

práctica por parte del observador, además de un complemento con otras técnicas de diagnóstico.

Según May (1984), Carneiro (1995), FAO (2006) los principales síntomas asociados a una deficiencia nutricional en el género *Pinus*, son los siguientes:

**Nitrógeno:** Pérdida de crecimiento, baja densidad de ramillas, acículas nuevas cortas y/o cloróticas (amarillentas), las más viejas pueden presentar manchas necróticas o de color pardo. Las raíces presentan un excesivo crecimiento.

**Fósforo:** Acículas fusionadas, torcidas y más cortas, de color púrpura pudiendo tener manchas necróticas; follaje de baja densidad presentando cambio de color a tonos amarillentos; menor crecimiento en altura a pesar de un aspecto saludable del plantín; disminución del desarrollo radicular.

**Potasio:** Acículas más cortas y cloróticas (castaño-rojizas, púrpuras o amarillentas en la parte distal); disminución del desarrollo radicular; menor lignificación de tejidos, pudiendo causar su muerte.

**Calcio:** Acículas de brotes terminales muy pequeñas, de coloración amarillenta seguida por una necrosis; en casos severos de deficiencia ocurre muerte de brotes, en algunos casos con exudación de resina.

**Magnesio:** Amarillamiento de las acículas de la parte superior del plantín, tornándose doradas en las puntas.

**Azufre:** Cambio de color de las acículas más nuevas que viran a amarillentas.

**Hierro:** Clorosis de acículas con ausencia de desarrollo de nuevos brotes.

**Manganeso:** Menor desarrollo de los plantines que lo normal; acículas cloróticas, presentando tejidos necróticos en casos avanzados de deficiencia.

**Zinc:** Menor desarrollo de los plantines que lo normal; acículas cortas, amarillentas, a veces con coloración bronceada en las extremidades; desarrollo de brotaciones laterales cortas.

**Cobre:** Menor desarrollo de los plantines que lo normal; acículas levemente amarillentas, pudiendo presentar deformaciones espiraladas; ramillas y brote terminal también doblados, con mayor crecimiento horizontal que vertical.

**Boro:** Acículas nuevas cloróticas y necróticas, en caso de deficiencia severa estas se secan y caen ocasionando muerte descendente. Brote terminal deteriorado que muere progresivamente avanza la deficiencia.

**Molibdeno:** Puntas de las acículas nuevas cloróticas, seguida por necrosis de tejidos; posteriormente la sintomatología se extiende la resto de los tejidos del plantín.

#### **2.2.2.2 Análisis de tejidos**

El análisis químico de tejidos vegetales consiste en establecer la concentración de un elemento (o fracción del mismo) en una muestra proveniente de una parte definida de la planta, tomada en una etapa determinada de su desarrollo fisiológico. De esta forma, el análisis de plantas se considera como una fotografía de la concentración de los nutrientes en el momento de tomar las muestras; por lo que se utiliza como herramienta para diagnosticar el estado nutricional de los plantines (Barbazán, 1998).

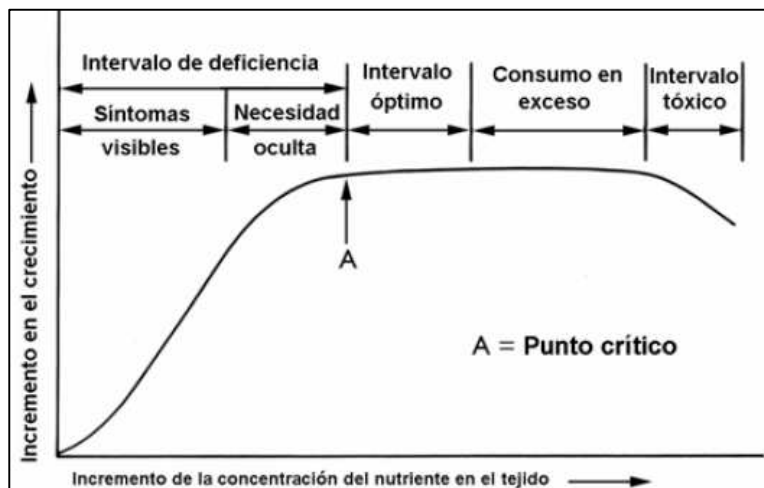
El análisis nutricional de tejidos más utilizado en los viveros forestales corresponde al análisis foliar, el cual refleja la disponibilidad de nutrientes en el sustrato, y también la capacidad de los plantines para extraerlo de la solución del medio de crecimiento. Debido a esto, la concentración de nutrientes minerales en el análisis foliar, es una medida verdadera de la efectividad del programa de fertilización llevado a cabo en el vivero (Landis 1989, Carneiro 1995).

La herramienta de análisis foliar se torna imprescindible a la hora de evaluar el estado nutricional de los plantines y orientar sobre la necesidad de fertilización, para obtener un óptimo rendimiento de los plantines (Landis 1989, Barbazán 1998).

A la hora de interpretar el análisis foliar se han desarrollado diferentes metodologías, las cuales se basan en la existencia de una relación característica entre la concentración de un nutriente mineral en el tejido de la planta y su crecimiento (Cuadro 5).



**Cuadro No. 5:** Curva característica que muestra la relación entre el crecimiento de las plantas y los niveles de nutrientes en los tejidos de la misma.



Fuente: Landis (1989).

El primer tramo de la curva representa el intervalo de deficiencia de un nutriente mineral, ya que éste se encuentra a bajas concentraciones que son capaces de limitar el crecimiento de la planta. Sobre el extremo inferior de éste intervalo, la planta exhibe los síntomas característicos de deficiencia descritos en la sección 2.2.2.1; más sobre la parte superior del mismo intervalo, la concentración del nutriente sigue siendo deficiente como para limitar el crecimiento de las plantas, pero en menor medida, ya que no provoca síntomas de deficiencia. Es común que se denomine a ésta situación como de necesidad oculta. Cuando la disponibilidad de un nutriente mineral no es limitante, el crecimiento de las plantas alcanza un comportamiento constante, llamado intervalo óptimo de nutriente; es en este intervalo donde ocurre la maximización del crecimiento. El siguiente intervalo corresponde a un consumo en exceso, y se presenta cuando un mineral está presente en el medio de crecimiento en cantidades excesivas; aquí las plantas continúan absorbiendo éste nutriente mineral, sin que exista un aumento del rendimiento. Finalmente el último intervalo corresponde al tóxico y se presenta cuando la concentración de un nutriente en el tejido de las plantas alcanza niveles extremadamente elevados, que provoca toxicidad nutricional en ella, y su crecimiento puede disminuir (Landis 1989, Barbazán 1998).

Una de las maneras de interpretar los resultados de un análisis foliar consiste en comparar la concentración de un nutriente mineral determinado en la materia seca de la muestra problema, con un valor de referencia para la especie llamado *nivel crítico* o concentración crítica para ese nutriente.

Como se observa en el cuadro 5, este nivel crítico surge de considerar las distintas relaciones que existen entre la concentración de nutrientes dentro de la planta y el crecimiento de la misma. El nivel crítico ocurre a la menor concentración del nutriente dentro del intervalo óptimo, y se puede definir como la concentración de nutrientes en la planta por debajo de la cual la tasa de crecimiento se reduce significativamente (Barbazán, 1998).

De manera general, May (1984) establece los diferentes niveles óptimos de los principales nutrientes minerales, para plantines de coníferas producidas en contenedor, adicionando para los macronutrientes la información de análisis de tallos y raíces.

**Cuadro No. 6:** Niveles óptimos de concentración de nutrientes para plantines en coníferas.

Nutrientes	Acículas	Tallos	Raíces
<b>Macronutrientes (%MS)</b>			
N	1.50	0.60	-
P	0.18	0.17	0.15
K	0.60	0.60	0.50
Ca	0.20	0.13	0.04
Mg	0.12	0.12	0.12
<b>Micronutrientes (ppm)</b>			
Na	200	-	-
Fe	175	-	-
Mn	300	-	-
Zn	50	-	-
Cu	3.5	-	-
B	7.0	-	-

Fuente: modificado de May (1989).

Una de las limitaciones más importantes que presenta la comparación del dato del análisis de planta con niveles críticos, es que son pocas las especies que se han investigado realmente dichos valores de referencia; además este valor varía dentro de una misma especie según las etapas de crecimiento de los plantines y el sistema de producción del vivero. Por tales motivos, cada vivero debería tener determinados sus propios estándares de análisis de plantas que mejor se adapten a sus condiciones de producción. Otra limitación de la técnica consiste en que sólo se define la parte más baja del intervalo óptimo (cuadro 5), sin proporcionar información acerca de cuando la concentración excede dicho intervalo, pudiendo llegar a ser tóxica (Landis 1989, Barbazán 1998).

La otra manera de interpretar los análisis foliares, consiste en comparar los resultados del análisis foliar de los plantines con respecto a un rango de suficiencia de referencia, correspondiente al intervalo óptimo del cuadro 5. Como dentro de este intervalo el crecimiento no se ve limitado, cualquier dosis de fertilización que haga crecer los plantines a un ritmo dentro de dicho intervalo, se considera adecuada.

De manera general, Landis (1989) proporciona los intervalos adecuados de concentración de nutrientes minerales, que deberían presentar los análisis foliares de plantines para coníferas producidas en contenedor.

**Cuadro No. 7:** Estándares de nutrientes minerales para plantines de coníferas.

Rango óptimo (brotes tiernos)	
<b>Macronutrientes (%MS)</b>	
N	1.40 - 2.20
P	0.20 - 0.40
K	0.40 - 1.50
Ca	0.20 - 0.40
Mg	0.10 - 0.30
S	0.20 - 0.30
<b>Micronutrientes (ppm)</b>	
Fe	60 - 200
Mn	100 - 250
Zn	30 - 150
Cu	4 - 20
Mo	0.25 - 5.0
B	20 - 100

Fuente: Landis (1989).

Al igual que la interpretación de los análisis foliares mediante el nivel crítico, el rango óptimo de concentraciones presenta la misma limitación con respecto a la información de cuales son los rangos más apropiados de cada nutriente mineral, para las diferentes especies producidas dentro del vivero. A su vez, presenta una ventaja con respecto al nivel crítico, dado que se informa sobre un valor máximo de concentración para los nutrientes minerales, considerando el intervalo de consumo en exceso. De esta manera, el rango de suficiencia de concentraciones permitiría un manejo más flexible de los datos (Landis 1989, Barbazán 1998).

## 2.3 MARCADORES MOLECULARES COMO HERRAMIENTA DE DIAGNOSTICO

El gran desarrollo que ha tenido en las últimas décadas la biología molecular, ha permitido disponer de un amplia y creciente gama de técnicas de marcadores genéticos, que son factibles de ser utilizadas como instrumento de diagnóstico y múltiples aplicaciones, presentándose una gran perspectiva de aplicación en la forestación (Alía et al. 2005, Araya et al. 2005).

Alía et al. (2005) definen un marcador molecular como *“cualquier biomolécula que presenta un polimorfismo detectable del que se puede extraer una información”*. Los autores restringen esta definición a los marcadores proteicos y de ADN, por corresponder más directamente al origen de la variación entre los seres vivos.

De manera similar, King y Stansfield, citados por Araya et al. (2005) establecen que *“un marcador genético puede definirse como un gen, cuya expresión fenotípica se puede discernir y puede ser utilizado para identificar a un individuo o una célula que contiene un determinado genotipo”*.

Alía et al. (2005), Araya et al. (2005) enumeran las propiedades generales que debería presentar un marcador molecular para que sea considerado útil:

**Polimorfismo.** El marcador debe permitir la detección de una proporción elevada de variantes de la información genética o de la biomolécula que se ha empleado como indicador entre las muestras en estudio. Stansfield, citado por Romano (2003) define al concepto de polimorfismo como *“la existencia de dos o más formas genéticas contrastantes de una característica dada en una población, a frecuencias mayores que las que pueden ser debidas a mutaciones recurrentes, donde la forma menos frecuente debe estar en una frecuencia de 1% o más”*.

**Codominancia.** El marcador debe permitir detectar las dos copias del locus presente en cada muestra (heredadas de cada una de uno de los progenitores).

**Distribución uniforme en el genoma.** El marcador debe estar distribuido por todo el genoma, de modo que su análisis permita estimar de una manera más eficiente la variabilidad existente entre las muestras analizadas.

**Discriminante.** En virtud de esta propiedad, el marcador permite distinguir nítidamente una muestra (o grupo de muestras) de otra.

Otras características deseables en un marcador molecular, que le otorga mayor valor como indicador indirecto de la base genética son:

**Independiente del ambiente.** La detección del marcador no debe verse influida por las condiciones ambientales del experimento y donde se desarrollan los organismos en estudio.

**Reproducible entre laboratorios.** Característica ligada con la anterior, permite la comparación de resultados.

**Rapidez.** El análisis que se realiza con un marcador molecular debe ofrecer sus resultados rápidamente, en el menor tiempo posible.

**Economía de análisis.** El estudio con un marcador molecular debe resultar económico y fácil de realizar.

### **2.3.1 Clasificación de los marcadores moleculares**

Según los criterios que se tomen en el momento de clasificar los marcadores moleculares, se distinguen diferentes grupos. Dichos grupos se diferencian según que tipo de técnica se aplique en el momento del análisis, tipo de información que proporcionan y características de la molécula o fragmento de molécula analizado (Jiménez y Collada, 2000).

Según Jiménez y Collada (2000) los marcadores se clasifican según la tecnología utilizada, diferenciándose dos grandes grupos: los basados en el análisis de proteínas y los basados en el análisis del ADN. Este último grupo a su vez, se divide en dos subgrupos: los que utilizan técnicas de revelado mediante hibridación con sondas marcadas, y los obtenidos mediante amplificación vía PCR (Polymerase Chain Reaction).

Otro criterio de clasificación empleado, se basa en como se presenta la información genética del organismo; si se presenta en condición diploide en los genes situados en el genoma nuclear, o haploide en aquellos ubicados en el genoma citoplasmático (mitocondria o cloroplasto); de esta forma los marcadores se caracterizan como haploides o diploides (Jiménez y Collada 2000, Gallo et al. 2006).

También se pueden clasificar los marcadores como codominantes o dominantes, en función de la posibilidad de distinguir los dos alelos en caso de heterocigosis, o si solo es posible observar el alelo dominante (Jiménez y Collada, 2000). Gallo et al. (2006) encuentran otros criterios más específicos

como ser, polimorfismo en el número de alelos, sí el marcador pertenece o no a regiones codificantes, complejidad técnica para desarrollar y utilizar el marcador y costo en el empleo del mismo.

### **2.3.1.1 Marcadores proteicos**

Los marcadores proteicos examinan los productos directos de la expresión de los genes, son generalmente codominantes y permiten el análisis a la vez de varios loci a bajo costo. Al estudiar indirectamente al ADN pueden aparecer diferentes efectos que dificulten su análisis, como ser el efecto ambiental en la expresión génica, el tiempo necesario para que un individuo exprese una característica (desarrollo fenológico del individuo), presencia de interacción con otros genes (epistasia) y redundancia del código genético (Jiménez y Collada 2000, Araya et al. 2005). Dentro de este grupo, se diferencian dos técnicas como las más utilizadas, el análisis isoenzimático y la electroforesis en dos dimensiones.

**Análisis isoenzimático.** Esta técnica se basa en la separación de las distintas formas moleculares que pueda tener una enzima (diferencias en la secuencia de aminoácidos, sin alterar su función proteica). Estas formas denominadas isoenzimas se pueden distinguir, en función de su carga neta total, cuando son sometidas a un campo eléctrico. En la sección 2.3.6 se describe en detalle dicha técnica.

**Electroforesis bidimensional de proteínas (2D-PAGE).** La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) es una técnica que permite separar e identificar una proteína sin actividad enzimática, de un combinado proteico complejo. En primera instancia (primera dimensión) las proteínas son separadas bajo un gradiente de pH hasta que se estabilicen en su punto isoeléctrico. La segunda separación (segunda dimensión) ocurre en función de sus pesos moleculares. Finalmente las proteínas en el gel se revelan mediante diferentes técnicas de tinción.

### **2.3.1.2 Marcadores de ADN**

Los marcadores de ADN permiten detectar la variación entre individuos al estudiar directamente las secuencias de nucleótidos de diversas regiones de sus genomas. Presentan la ventaja con respecto a los marcadores proteicos, de no verse afectados por condiciones del ambiente ni de la etapa de desarrollo de los individuos analizados. Se caracterizan también por presentar un elevado nivel de polimorfismo, al examinar tanto la información genética que se expresa como la que no lo hace, y presentar diferentes características en cuanto a su

tipo de herencia (ADN nuclear, mitocondrial o cloroplasto) y dominancia (dominante y codominantes) (Jiménez y Collada, 2000).

**RFLPs (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción).** La metodología de estos marcadores se basa en el uso de enzimas de restricción. Estas enzimas de origen bacteriano, reconocen secuencias específicas de nucleótidos de la molécula de ADN del organismo a estudiar, las cuales son cortadas en el sitio donde se encuentra dicha secuencia (sitios de restricción). Los fragmentos de ADN obtenidos luego de la aplicación de dichas enzimas, pueden separarse en un gel de electroforesis, donde los fragmentos más pequeños (de menor peso molecular) tienen mayor movilidad electroforética por lo que migrarán más lejos del punto de aplicación que los de mayor tamaño. Finalmente las posiciones que toman en el gel los fragmentos de ADN de diferente tamaño (polimorfismo) se detecta por hibridación con una sonda específica (un fragmento de secuencia conocida marcado mediante radiactividad o quimioluminiscencia), que es homóloga a un determinado fragmento del genoma, razón por la cual se hibridan entre sí (Ramírez et al. 1991, Jiménez y Collada 2000, Alía et al. 2005).

La técnica de RFLPs presenta como desventaja ser costosa y laboriosa, además requiere el uso de sondas marcadas generalmente con radioactividad, una elevada cantidad de ADN, información previa sobre las secuencias en estudio para seleccionar la sonda a utilizar.

**RAPDs (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico).** Esta técnica utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como sistema de amplificación *in vitro* de ADN. Dicha reacción se basa en la obtención de un gran número de copias de fragmentos de ADN molde (secuencia de un organismo a estudiar), mediante la acción de una ADN-polimerasa. Dicha enzima requiere la presencia de una secuencia de oligonucleótidos que actúe como iniciador para comenzar la replicación de una de las hebras del ADN: esta primera hebra copia de una de las cadenas de nucleótidos del individuo a estudiar, actuará como molde en el segundo ciclo de acción de la enzima, a partir del cebador utilizado inicialmente, copiando la primera hebra obtenida en su secuencia complementaria. En RAPDs los cebadores son arbitrarios, o sea no se conoce previamente ni la ubicación ni el tamaño de la secuencia de ADN a la cual reconocerá y copiará, por lo que la ADN-polimerasa va replicar en cada hebra del ADN molde, los fragmentos comprendidos entre dos zonas que sean complementarias al iniciador utilizado las cuales tienen posiciones inespecíficas en los ADN molde (en posición arbitraria en el organismo a estudiar, pero que sea complementaria al ADN molde). Esta copia de secuencias se puede repetir tantas veces se desee, siguiendo un protocolo de ciclos de tiempo y temperatura específicos para su desarrollo. Finalmente los fragmentos

obtenidos durante la amplificación son separados por electroforesis y detectados mediante una tinción específica del ADN, generalmente bromuro de etidio (Jiménez y Collada 2000, Alía et al. 2005).

Una característica de los RAPDs es que el análisis de las electroforesis, se efectúa por la presencia o ausencia de bandas (polimorfismo) para los fragmentos de ADN obtenidos por acción de la polimerasa, los cuales pueden ser de la misma o diferente longitud, dependiendo de la distancia en el organismo a estudiar entre sitios que tengan secuencias complementarias al cebador. Si la secuencia presenta diferencias en la cadena de nucleótidos de origen materno y paterno, se detectará en la electroforesis un fragmento amplificado de mayor tamaño, por lo tanto son marcadores dominantes. Una de las mayores ventajas que presenta esta herramienta, es que se trabaja con cebadores universales, o sea que se aplican a cualquier especie, pero se desconoce la información de la secuencia que se amplifica. La existencia de cebadores universales hace de RAPDs una técnica de bajo costo y sencillez de aplicación (Jiménez y Collada 2000, Alía et al. 2005). Sin embargo, presenta problemas en su reproducibilidad y podrían cometerse errores al momento de hacer un análisis entre especies que compartan similitudes en su genoma (Araya et al., 2005).

**Microsatélites o SSRs (Repeticiones de Secuencias Simples).** Los microsatélites son repeticiones de secuencias simples (de hasta seis nucleótidos, motivo de repetición) que aparecen esparcidos por todo el genoma nuclear y también en el extra nuclear. Están típicamente constituidos por el motivo de repetición (que se puede repetir varias veces dentro del mismo microsatélite, polimorfismo), y dos regiones flanqueantes (cebadores o iniciadores), que se encuentran a ambos lados del motivo de repetición. Al igual que los RAPDs, los microsatélites utilizan la técnica de PCR para amplificar una secuencia a partir de ADN molde; para ello previamente se debe conocer la secuencia que flanquea al microsatélite, para de esta manera construir un cebador homólogo (específico) a dichas regiones. Una vez replicados los fragmentos de ADN obtenidos son separados en función de su peso molecular por electroforesis; para detectar los diferentes fragmentos (polimorfismos) se emplean generalmente en la reacción de polimerización, nucleótidos marcados con algún fluorocromo, lo que permite la identificación por fluorescencia de los diferentes fragmentos obtenidos en la electroforesis. Dichos polimorfismos se deben a diferencias de peso molecular producidas por distintos números de los motivos de repetición que se presentan en los individuos analizados (Jiménez y Collada 2000, Alía et al. 2005).

La técnica muestra como ventajas un alto grado de polimorfismo, debido a que los microsatélites se corresponden con regiones hipervariables del



genoma; se trata de marcadores codominantes, por lo que se pueden distinguir las muestras que son homocigotos para el motivo de repetición de las heterocigotos; para el caso de utilizar genoma nuclear; también presentan una alta repetitividad y sencillez a la hora de su análisis.

**AFLPs (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados).** Los marcadores AFLPs combinan las técnicas que emplean enzimas de restricción como los RFLPs con las basadas en el empleo de la reacción de PCR sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar. En lo que corresponde al empleo de enzimas de restricción, el ADN genómico es digerido mediante dos enzimas de restricción; en primer lugar se utiliza una enzima de baja frecuencia de corte que reconoce de 6 a 8 pares de bases, y en segundo término, una de frecuencia media o alta de corte que reconoce 4 pares de bases. Una vez que se obtiene un elevado número de fragmentos de ADN, se añaden en los extremos de estos unos adaptadores (fragmentos de ADN de doble cadena con 20 a 30 pares de bases, complementarios a los sitios de corte de cada enzima de restricción) para conformar el iniciador del ADN a amplificar. Con la obtención del ADN inicial, comienza la etapa correspondiente a la polimerización vía PCR, donde se efectúan dos amplificaciones selectivas; este paso no se efectúa a todos los fragmentos obtenidos originalmente sino que solo a una subpoblación, de manera de facilitar el análisis en una electroforesis en gel de poliacrilamida. Finalmente la detección de las bandas de la electroforesis se realiza por hibridación con una sonda marcada, o eventualmente con un compuesto fluorescente que reconocerá diferencialmente los fragmentos que hayan sido amplificado a partir de las secuencias complementarias de cualquiera de las dos enzimas de restricción aplicadas inicialmente (Alía et al. 2005, Martínez et al. 2010).

La interpretación de la electroforesis se realiza en base a la ausencia o presencia de bandas definidas por fragmentos de ADN amplificado de diferente peso molecular; por lo tanto la base genética de los marcadores AFLPs es del tipo dominante. Como desventaja los AFLPs requieren de una infraestructura considerable para su implementación en el laboratorio, además de ser relativamente laboriosos y costosos a la hora del análisis.

### **2.3.2 Análisis isoenzimático**

Las proteínas son biomoléculas formadas por una o varias cadenas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. La secuencia de dichos aminoácidos en una proteína (estructura primaria) está determinada genéticamente mediante el código genético. De los veinte aminoácidos codificables, dieciséis son eléctricamente neutros y cuatro están ionizados

(cargados). Dentro de éste último grupo se encuentran los aminoácidos catiónicos (básicos) lisina y arginina y los aminoácidos aniónicos (ácidos) aspartato y glutamato. De esta manera, la carga neta de una proteína va a depender del signo de la suma de las diferentes cargas parciales de los aminoácidos presentes en ella (Ramírez et al. 1991, Romano 2003).

Cuando una proteína cargada eléctricamente es sometida a un campo eléctrico, ella se moverá hacia el electrodo que tenga carga neta opuesta a la suya. La carga neta de una proteína entre pH 7 y 8 generalmente es negativa, por lo que cuando es sometida a un campo eléctrico migrará hacia el polo positivo. De esta manera, cuando una proteína electronegativa es colocada próximo al cátodo de un campo eléctrico, migrará más al ser atraída por el mismo ánodo y una proteína electropositiva migrará menos al ser atraída por el cátodo.

Mediante la técnica de electroforesis, las proteínas presentes en los extractos crudos de los tejidos vegetales pueden ser separadas y visualizadas para su posterior análisis. Dicho método se basa en la propiedad que las proteínas no desnaturalizadas con diferentes cargas netas, poseen diferentes rangos de migración a través de una matriz o soporte al aplicase una corriente eléctrica (Ramírez et al. 1991, Romano 2003). Según Ramírez et al. (1991) además de la carga neta de una proteína, existen tres factores más que determinan la movilidad de una proteína bajo condiciones de electroforesis: (i) el pH que está directamente relacionado a la carga neta de la proteína. Éstas al ser electrolitos débiles, su ionización está muy afectada por el pH del medio que las rodea. En la realización de la electroforesis, la carga neta de una proteína puede ser controlada utilizando diferentes sistemas buffer. (ii) La intensidad del campo eléctrico (medida en mA) aplicada durante la electroforesis, que afecta directamente la movilidad de las proteínas. (iii) las fuerzas de fricción, las cuales se oponen a la migración. Según Murphy et al., citados por Romano (2003), el tamaño y la forma de la proteína afecta la migración de la misma, al interactuar con la matriz electroforética según el tamaño del poro de la matriz. El tamaño de los poros está determinado por ejemplo por la concentración de poliacrilamida en el gel (Ramírez et al., 1991).

Una vez separadas las isoenzimas por medio de la electroforesis, se las puede localizar en la matriz que ha sido sometida al campo eléctrico, para su posterior análisis. Para el proceso de detección de actividad isoenzimática específica se utilizan técnicas histoquímicas propias de cada una de ellas, las cuales permiten identificar enzimas particulares. Así la tinción selectiva de isoenzimas individuales se resolverá como un patrón de bandas característico (Romano, 2003). En el procedimiento de tinción, se coloca la matriz de separación (gel de poliacrilamida, almidón, acetato de celulosa, agarosa) en

una bandeja de tinción que contiene el sustrato necesario para que actúe la isoenzima correspondiente, coenzimas y/o cofactores requeridos para la actividad de la isoenzima y un colorante adecuado que tiña el producto de la reacción enzimática, que ponga en evidencia la presencia y posición de las isoenzimas en la matriz de migración, al formarse una o varias bandas visibles a simple vista (Ramírez et al. 1991, Ramírez 2003, Romano 2003). Por lo tanto, gracias al procedimiento de revelado, de los cientos o miles de enzimas presentes en el extracto crudo de un vegetal, pueden identificarse exclusivamente las enzimas que catalizan una reacción particular, utilizando el sustrato y cofactores correspondientes.

Los resultados obtenidos de la aplicación de electroforesis de isoenzimas tienen la particularidad que pueden ser interpretados en términos genéticos. Esto se basa en el supuesto que las distintas movilidades en un campo eléctrico, son una consecuencia de cambios en la secuencia del ADN codificante de proteínas. De esta manera, si el patrón de bandas de dos individuos difiere, se asume que estas diferencias tienen una base genética, y por lo tanto son heredables (Murphy et al., citados por Romano, 2003). Esta última propiedad, constituye una de las características más relevantes de las isoenzimas como marcadores moleculares, y es la base genética simple que tienen la mayoría de los polimorfismos isoenzimáticos (Weeden y Wendel, citados por Romano, 2003).

Una de las ventajas de la técnica de isoenzimas como marcadores moleculares es la reproductibilidad del patrón de bandas obtenido cuando se utilizan extractos de un mismo tejido, el mismo estado fisiológico de la planta y bajo las mismas condiciones de concentración de la matriz (gel), migración electroforética y tinción (Ramírez y Roca, citados por Ramírez, 2003). Otra de la ventaja de las isoenzimas es la expresión codominante de las variantes (alelos) de un determinado locus. Esta condición codominante permite diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos, así como la asignación de un genotipo dado a partir de un patrón de bandas observado (fenotipo) (Ramírez 2003, Romano 2003). Otras características de las isoenzimas que resultan sumamente valiosas son, su estabilidad en el número de loci y la consistente compartimentación subcelular (Romano, 2003). El equipamiento y los materiales necesarios para desarrollar esta técnica y obtener patrones de bandas, son relativamente de bajo costo y es posible analizar grandes cantidades de muestras en poco tiempo (Jiménez y Collada 2000, Romano 2003).

La principal desventaja que presenta la técnica radica en los bajos niveles de polimorfismo que se detectan por la naturaleza de la técnica, por lo que el número de loci isoenzimáticos que se pueden analizar es limitado

(Jiménez y Collada 2000, Romano 2003). Sumado a esto, los sistemas de tinción desarrollados hasta el momento no detectan las enzimas que están por debajo de sus límites actividad, las proteínas estructurales y las enzimas que están presentes en el extracto pero no pueden detectarse porque aún se desconoce la forma de teñir sus productos (Ramírez et al., 1991). Otras limitaciones del análisis isoenzimático, es que dicha técnica no permite detectar sustituciones de aminoácidos que no alteran la carga neta de la proteína. También presentan el inconveniente de que representan solamente una pequeña porción de todo el genoma del individuo analizado. También es una limitante que las isoenzimas empleadas puedan estar influenciadas por el estado fisiológico del organismo en estudio y/o que se exprese en un tejido específico. De esta manera, algunas isoenzimas pueden expresarse mejor en ciertos tejidos como las raíces, mientras que otras pueden expresarse mejor en las hojas. Por esta razón es necesario analizar varias muestras de la población para ensayar todas las isoenzimas disponibles (Ramírez et al. 1991, Romano 2003).

### **2.3.3 Uso de marcadores moleculares en forestación**

Dentro del rubro forestal la utilización que se le ha dado a los diferentes marcadores moleculares, se pueden resumir en la cuantificación y caracterización de la diversidad genética (tanto de poblaciones naturales como de colecciones de conservación) y en la selección de diferentes materiales dentro de un programa de mejoramiento genético.

Es sabido que las poblaciones naturales de árboles presentan un alto nivel de variabilidad, entre los cuales, el género *Pinus* aparece como uno de los de mayor índice (Hamrick et al., citados por Solís e Iglesias, 2001). Loo (2004) afirma que entre un 90 a 95% de la variación isoenzimática de las especies arbóreas corresponde a la variación interpoblacional, y el restante 5 a 10% a la extrapoblacional. Los parámetros que se utilizan para evaluar dicha variación interpoblacional corresponden al porcentaje de loci polimórficos, número de alelos por locus, número efectivo de alelos por locus, y la proporción media de loci heterocigotos por individuo (Velázquez, 2004).

Se han desarrollado y aplicado con éxito marcadores moleculares con el fin de caracterizar e identificar poblaciones forestales, las que incluyen principalmente comparaciones de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones a través de grandes distancias geográficas, comparaciones de la estructura genética entre especies, y la determinación de la subestructura de una población a través de los diferentes microclimas en los que se encuentra (Solís e Iglesias 2001, Velázquez 2004).

Cuando se trabaja con cultivos *in vitro* para la multiplicación y preservación de germoplasma, los marcadores moleculares pueden ser útiles para detectar la variación somaclonal que pueda ocurrir en el proceso. Una vez obtenidos los nuevos tejidos, se caracteriza al nuevo material para confirmar que no hayan ocurrido cambios en el genotipo original de interés (Ramírez et al. 1991, Loo 2004).

También se han utilizado marcadores moleculares para estudiar la dinámica del movimiento de alelos en una población. Estos estudios se basan en marcadores moleculares ya que resultan una herramienta adecuada para analizar los procesos que actúan sobre las poblaciones, como ser flujo genético, deriva genética y niveles de endogamia (Jiménez y Collada 2000, Furnier 2004, Ledig 2004). Con estas herramientas además se han realizado estudios sobre la historia de una población, particularmente sobre los patrones geográficos de distribución y la importancia del aislamiento histórico (Moritz, citado por Jiménez y Collada, 2004). A partir de los datos obtenidos de marcadores moleculares, es posible entender la conectividad entre poblaciones naturales fragmentadas y delimitar los alcances geográficos del concepto de población genética (Gallo et al., 2006).

Uno de los mayores usos que se le ha dado a estas herramientas de análisis genéticos, dentro del estudio de especies arbóreas, consiste en establecer relaciones de paternidad y análisis de parentesco, lo que contribuye a la evaluación de la dispersión de polen y semillas. En menor medida se ha trabajado con éxito utilizando marcadores moleculares para estudios de clasificación taxonómica y de relaciones filogenéticas (Jiménez y Collada 2004, Gallo et al. 2006).

Los datos genéticos permiten comparar las tendencias actuales con las históricas de una población, y comprobar si se están produciendo procesos que comprometan la supervivencia de la misma (Jiménez y Collada, 2004). En este sentido, Müller-Starck y Schubert, citados por Jiménez y Collada (2004) utilizan marcadores moleculares como bioindicadores, como manera de medir la respuesta de una población frente a impactos ambientales tolerados por ella; de este modo se puede llegar a observar los cambios genéticos que ocurren asociados a la presión selectiva originada por nuevos factores de estrés.

En lo que respecta a programas de mejoramiento genético de especies forestales, son numerosas y diversas las aplicaciones que presentan los marcadores moleculares. De modo general se han logrado resultados muy importantes en la búsqueda de resistencia a enfermedades e insectos, aumento

en el volumen de cosechas, tasas de crecimiento y calidad de la madera (Ajmone et al., citados por Araya et al., 2005).

Desde una perspectiva particular, se ha venido dando utilidad a los marcadores moleculares en la selección de razas de diferentes procedencias, selección de cruza de familias e individuos en pruebas de progenies (Ledig, 2004); identificación de material de reproducción tales como clones, familias, procedencias y el ya mencionado análisis de parentesco (Jiménez y Collada 2000, Gallo et al. 2006); estudios de caracterización del sistema reproductivo y monitoreo de cruces controlados (Jiménez y Collada, 2000); diseño de los huertos semilleros, determinación del porcentaje de contaminación con individuos no deseables en la polinización, sobre todo en especies anemófilas (Gallo et al., 2006).

Cada vez es mayor la relevancia que toman los marcadores moleculares en los protocolos de certificación de los diferentes materiales (población base, de reproducción, comercial, etc.), sirviendo como complemento (o eventualmente sustitución) para la determinación de la pureza genética de dichos materiales (Alía et al. 2005, Araya et al. 2005).

Sin duda los marcadores moleculares toman relevancia a la hora de trabajar con especies forestales, dado que en algunos casos (como en evaluación, selección y verificación de los materiales disponibles), los procedimientos tradicionales requieren al menos medio ciclo de rotación del cultivo para que los materiales expresen sus características fenotípicas; de esta manera, utilizando marcadores moleculares se reduce significativamente los tiempos de trabajo, logrando resultados con mayor rapidez (Araya et al., 2005).

## **2.4 CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES**

En condiciones naturales, las plantas se encuentran continuamente en contacto con poblaciones de microorganismos. Dentro de estas interacciones pueden existir relaciones altamente perjudiciales para la planta, hasta aquellas que benefician tanto a ella como al microorganismo. Si bien las plantas están expuestas a una amplia gama de microorganismos patogénicos que las pueden atacar generando enfermedad, lo normal en la naturaleza es que éstas se encuentren sanas. Como consecuencia de una estrecha coevolución entre las plantas y los microorganismos, las plantas se han adaptado a sobrevivir en un ambiente colonizado por microorganismos, y algunos de éstos (los patógenos) pueden desarrollarse de forma patogénica solo en un ámbito limitado de plantas (Madriz 2002, Mondino y Vero 2006).

Además de las interacciones entre plantas y microorganismos, también suceden continuas interacciones entre poblaciones de microorganismos, muchas de las cuales pasan inadvertidas para el ser humano. Un tipo especial de interacción entre microorganismos que despierta gran interés, es la que se da entre los potenciales fitopatógenos y sus antagonistas; que en definitiva son los que ayudan a que no se genere enfermedad en las plantas.

El control biológico de enfermedades en plantas toma a esta última interacción entre microorganismo como principio de acción; en donde lo que se busca es potenciar esas interacciones que se dan entre poblaciones de microorganismos en forma natural. Sabiendo las interacciones que ocurren entre los microorganismos, y la de los microorganismos con la planta, se puede idear técnicas que utilicen estas interacciones para controlar las poblaciones de fitopatógenos e impedir que se desarrolle la enfermedad en la planta; o sacar provecho de las relaciones benéficas, favoreciendo el crecimiento de la planta o resistencia a patógenos (Mondino y Vero, 2006).

Complementando a la ya proporcionada definición amplia de control biológico de Cook y Beker, Mondino y Vero (2006) definen de una manera más restringida al control biológico como “*la introducción artificial de organismos antagonistas en el patosistema, para controlar el patógeno y favorecer a la planta, reduciendo el inóculo del patógeno y/o a la intensidad de los síntomas posteriores a la infección*”.

De los muchos microorganismos que han demostrado ser eficientes como antagonistas de fitopatógenos del suelo, las especies más ampliamente estudiadas y aplicadas como biocontroladores corresponden a los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Penicillium*. Especies del género *Trichoderma* han manifestado importante actividad antagónica para controlar los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* (entre otros), en diversos cultivos de importancia económica a nivel de campo. *Trichoderma* spp. también ha demostrado capacidad de promocionar el crecimiento de diversas especies de plantas. Estas características del antagonista, hacen que en la actualidad, a nivel mundial existan diferentes formulados comerciales en base a este hongo, incluso a nivel nacional.

#### **2.4.1 El género *Trichoderma* spp.**

El género *Trichoderma* spp. esta compuesto por un grupo de especies de hongos, que se encuentra en forma natural como saprofitos del suelo y de la madera, asociado a la rizósfera, o como parásito de otros hongos. Dicho género presenta la capacidad de adaptarse a varios ambientes, por lo que muestra una

distribución cosmopolita. Habitualmente las especies de *Trichoderma* spp. muestran una dominancia sobre la población de la microflora edáfica, debido a su comportamiento agresivo y de competitividad (Gams y Bissett 1998, Infante et al. 2009).

En un principio las colonias de *Trichoderma* spp. presentan un color blanquecino suave, pero en poco tiempo debido a su vertiginoso crecimiento, se tornan de color verde intenso. El micelio es septado e hialino, del cual se originan los conidióforos de aspecto aterciopelados irregulares, cortos y muy bifurcados. Las ramas principales del conidióforo producen ramas laterales que pueden presentarse en forma verticilada o no; a su vez estas ramas pueden bifurcarse nuevamente. Todas las ramas primarias y secundarias se levantan aproximadamente sobre 90° con respecto al eje principal. En caso que la bifurcación se presente en forma verticilada, el conidióforo toma un aspecto piramidal. En la mayoría de los casos, el conidióforo termina en una o más fiálides con formas cilíndricas o casi subglobosas, que le dan el aspecto a una botella. Sobre las partes terminales de éstas se forman las esporas (conidios) unicelulares y esféricas, de tonalidades verdes (a veces pueden ser hialinas), con paredes lisas o ásperas, que se disponen en forma de racimos globosos (con disposición de gloióspora) que se separan con facilidad. Como estructura de resistencia pueden formar clamidosporas unicelulares (excepcionalmente multicelulares) de forma subglobosa. Las clamidosporas se disponen en forma intercalar en la célula hifal, o terminal sobre una hifa corta (Gams y Bissett 1998, Infante 2009).

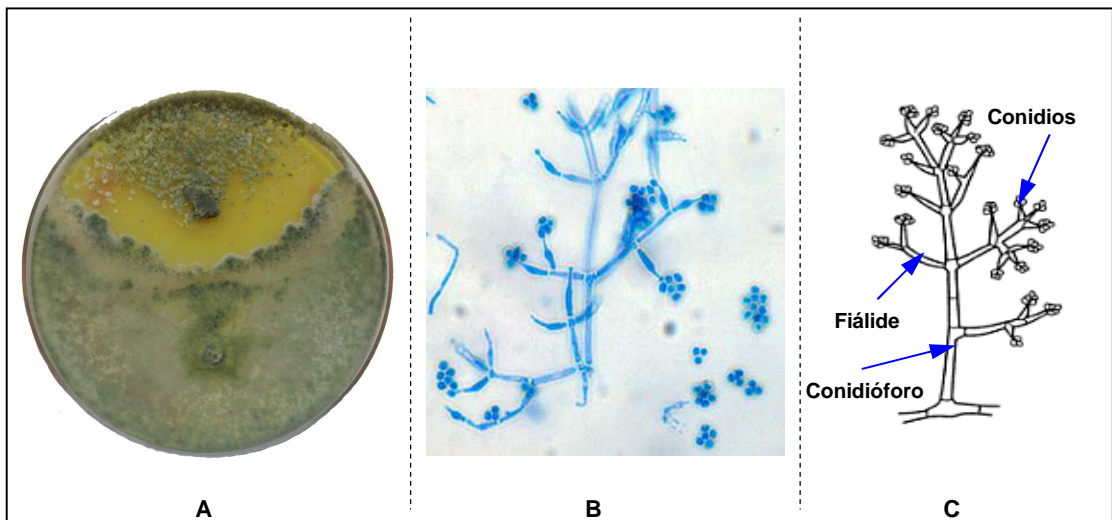
#### **2.4.1.1 Clasificación taxonómica**

Desde que Persoon en 1794 propuso por primera vez a *Trichoderma* como un género, ha habido una innumerable cantidad de trabajos con el fin de caracterizar e identificar a las especies que conforman dicho género.

Si bien la identificación de *Trichoderma* como género resulta relativamente fácil, el concepto de especie es difícil de interpretar y hay una considerable confusión sobre la aplicación de nombres específicos. Por este motivo, la taxonomía de la especie es imprecisa, y los criterios utilizados para clasificarla e identificarla no proporcionan la discriminación suficiente (Grondona et al., 1997).



**Figura No. 2:** **A** – Cepa nativa de *Trichoderma harzianum* aislada de un escleroto de *Sclerotinia sclerotiorum* creciendo sobre medio de cultivo TSA. **B** – Hifas y conidióforos de *Trichoderma harzianum* (1cm = 20 µm). **C** – Esquema de conidióforo de *Trichoderma harzianum*. (**B** modificado de University of Adelaide, s.f.).



Los primeros estudios de clasificación se basaron en la taxonomía tradicional, donde se trabajaba en función de las diferencias morfológicas de las colonias, principalmente en la estructura del conidióforo como ser: tasa media de crecimiento de cultivos; dimensiones, ramificación y agregación de los conidióforos; color, dimensión y disposición de los conidios en el conidióforo (Gams y Bissett, 1998). Otros métodos taxonómicos complementarios a los morfológicos correspondieron al estudio de metabolitos secundarios, ya que el género muestra una gran diversidad al respecto.

En un tiempo más reciente con el desarrollo de la biología molecular, la secuenciación del ADN pasa a convertirse cada vez más en una herramienta importante de diagnóstico dentro de la taxonomía. En el presente, las secuencias de múltiples genes se utilizan para inferir filogenias de las especies (o mejor dicho niveles de taxa, que corresponden a especies, formas y variedades), y también para inferir la evolución de los rasgos físicos (Lutzon et al., citados por Samuels, 2006). Actualmente se dispone de bancos de base de datos digitales, donde se representan las secuencias de base de la región ITS y múltiples genes, para todas las taxas aceptadas hasta la fecha. Las dos bases de datos más completas sobre el género *Trichoderma* e *Hypocrea* (su teleomorfo) son el GenBank correspondiente a la NCBI (National Center for Biotechnology Information); y la TrichoKEY correspondiente a la ISTH

(International Subcommittee Trichoderma and Hypocrea). Sin dudas estas herramientas contribuyen a una mejor caracterización e identificación de las especies (taxa) de *Trichoderma* (Samuels, 2006).

Desde el comienzo del estudio del género *Trichoderma* se conoce el vínculo estrecho que hay entre éste e *Hypocrea*. A medida que han avanzado dichos estudios, el estado teleomorfo de varias especies del género *Trichoderma* se han relacionado con *Hypocrea*, como ser *Trichoderma harzianum* y su teleomorfo *Hypocrea lixii* y *Trichoderma virens* con *Hypocrea virens* (Chaverri y Samuels, citados por Samuels, 2006). Sin embargo otras especies de *Trichoderma* no han sido vinculadas a una fase sexual. De manera similar, el estado anamorfo de varias especies de *Hypocrea* no se corresponden al género *Trichoderma* y son clasificadas dentro de otros géneros como *Acremonium* o *Verticillium*. Todo este complejo estado de clasificación taxonómica, ha llevado a que en la actualidad no se haya dado una subdivisión formal de *Trichoderma* e *Hypocrea*; es más, continuamente nuevas especies se añaden al género (Samuels, 2006).

Hoy en día utilizando técnicas moleculares filogenéticas, se han identificado 83 taxa de *Trichoderma* e *Hypocrea*; de las cuales 72 corresponden a la especie *Trichoderma*, donde 19 especies no han sido vinculadas al teleomorfo *Hypocrea*. Dentro del género *Trichoderma* se han considerado 5 especies como antagonistas: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *Trichoderma viride* (Samuels, 2006).

El estado anamorfo de éste hongo es clasificado por Agrios (2004) de la siguiente manera:

**Reino:** Fungi.

**Filo:** Ascomycota.

**Clase:** Ascomycetes.

**Subclase:** Pyrenomycetes.

**Orden:** Hypocreales.

**Género:** *Hypocrea*.

Por su parte, Alexopoulos (1966) clasifica al estado teleomorfo de la siguiente manera:

**Reino:** Fungi.

**Subdivisión:** Deuteromycetes.

**Clase:** Hypomycetes.

**Orden:** Hyphales.

**Familia:** Moniliaceae.

**Género:** *Trichoderma*.

## **2.4.2 Factores que afectan el crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* spp.**

### **2.4.2.1 Disponibilidad de nutrientes**

El género *Trichoderma* se caracteriza por ser un grupo de hongos con una notable capacidad de metabolizar una diversidad de sustratos, lo que trae como resultado que éste género de hongos sea dominante sobre la microflora del suelo, y en las más variables condiciones.

Como fuentes de carbono *Trichoderma* puede utilizar desde simples, hasta complejas moléculas para su crecimiento. Las fuentes de carbono más comunes incluyen una gama de oligosacáridos, que en términos generales, corresponden a la inulina, melecitosa, rafinosa, y sacarosa. También es común que éste género degrade una variedad de polisacáridos incluyendo celulosa, hemicelulosa, laminarina, pectina, almidón y xilano; además de polímeros relacionados como la quitina (Danielson y Davey, citados por Klein y Eveleigh 1998, Kubicek-Pranz 1998). Como alternativa a estos compuestos, se utilizan como fuente de carbono purinas, piridinas, aminoácidos, taninos y ácidos orgánicos de cadena larga (Papavizas, citado por Cabrera y Tejera, 2002). Incluso Tye y Willets, citados por Klein y Eveleigh (1998) señalan que *Trichoderma* es uno de los pocos grupos de organismos que pueden metabolizar los compuestos C1, como el metanol. Además, muchas especies tienen la capacidad de transformar o incluso degradar compuestos complejos y persistentes como hidrocarburos y agroquímicos como el alacloro, DDT, aldrina, dieldrina, malatión y dalapon (Klein y Eveleigh, 1998).

Como fuentes de nitrógeno, *Trichoderma* presenta un amplio espectro de compuestos. Dentro de los inorgánicos, el amonio representa la mayor

fuente de nitrógeno, seguida por el nitrato (Danielson y Davey, citados por Kubicek-Pranz, 1998). Según Cabrera y Tejera (2002) otras fuentes inorgánicas corresponden a la urea, y el nitrito. En lo que respecta a las fuentes orgánicas más utilizadas, se encuentran los aminoácidos alanina, ácido aspártico y glutámico (Danielson y Davey, citados por Kubicek-Pranz, 1998). Se ha observado también que *Trichoderma viridae* puede utilizar las bases purínicas, la purina de nucleósidos y los nucleótidos correspondientes como única fuente de nitrógeno (Pommere et al., citados por Kubicek-Pranz, 1998).

Estudios realizados para la mayoría de los aislamientos de *Trichoderma* de tipo salvaje, demostraron que elementos distintos del carbono y nitrógeno se puede obtener de fuentes inorgánicas, y no hay necesidad de factores de crecimientos complejos o vitaminas (Kubicek-Pranz, 1998).

Otros nutrientes demandados por *Trichoderma* bajo la forma de minerales corresponden al fósforo, azufre, hierro y calcio. Se sabe que la mayoría de las especies de éste hongo son capaces de utilizar fosfato y sulfato inorgánico como fuentes de fósforo y azufre respectivamente. El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de *Trichoderma*, pero se requiere en bajas concentraciones; su mayor parte es absorbida del medio bajo la forma de ión férrico, mediante la producción de sideróforos (sección 2.4.3.1) (Kubicek-Pranz, 1998). Krystofova et al., citados por Kubicek-Pranz (1998) demostraron que el calcio tiene influencia tanto en el crecimiento vegetativo, así como la esporulación del hongo y también se ve involucrado en diferentes mecanismos bioquímicos. También se sabe que su absorción se ve gravemente afectada por la presencia de iones de metales pesados (Kubicek-Pranz, 1998).

Otros minerales bajo la forma de iones son también importantes para el crecimiento del hongo, pero se requieren en muy pequeñas concentraciones; mientras que sus altas concentraciones inhiben el crecimiento. Por ejemplo Frank et al., citados por Kubicek-Pranz (1998), demostraron que concentraciones entre 1 a 10 mM de los iones  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  dan lugar a la inhibición del crecimiento y aparición de morfología aberrante del hongo.

Todos los estudios detallados anteriormente, referidos a los requerimientos nutricionales por parte de especies pertenecientes al género *Trichoderma* son llevados a cabo bajo condiciones artificiales, las cuales distan mucho en referencia a las que el hongo va a ser introducido para sacar beneficio de sus funciones. Dichos ensayos se realizan mediante el aislamiento y siembra (en medios de cultivos selectivos), de las diferentes cepas bajo la técnica de cultivos puros; donde el hongo no presenta competencia. Cuando *Trichoderma* es utilizado en viveros forestales como agente de control biológico, su inclusión al sistema sustrato-plantín puede llegar a generar una competencia

por nutrientes entre el plantín y el hongo, en el caso de que algunos de los nutrientes se presente bajo una forma poco disponible o en niveles inferiores a los requeridos por ambos organismos. Cuando se llega a este punto de competencia entre nutrientes, la producción de plantines de calidad, se va a ver sin dudas afectada sobre todo en lo que refiere a los parámetros fisiológicos de requerimientos de nutrientes (sección 2.1.3.2). En caso extremo de déficit de nutrientes, también va a ocurrir una disminución de la población del hongo dentro del sustrato, llegando incluso a comprometer la supervivencia del mismo. Por esta razón, es importante manejar los niveles de nutrientes en un rango adecuado una vez que el sustrato es inoculado con *Trichoderma*; prestando especial atención en caso de que el sustrato utilizado sea de tipo inerte (arena, corteza de pino, etc.), donde prácticamente todo el aporte de nutrientes es proporcionado mediante fertilizaciones periódicas.

#### **2.4.2.2 Temperatura**

A nivel mundial existe una correlación positiva entre la distribución natural de las diferentes especies de *Trichoderma*, con respecto a las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan. Este fenómeno se evidencia debido a que cada especie presenta diferentes requisitos de temperatura óptima. Por ejemplo, se ha visto que *Trichoderma viridae* se adapta mejor a las regiones de temperatura fría, mientras que *Trichoderma harzianum* es característico de los climas cálidos (Danielson y Davey, citados por Klein y Eveleigh, 1998). Comprendida esta correlación, es evidente que las especies originarias de climas más cálidos tienen una mayor temperatura óptima y viceversa.

Dentro del amplio rango de temperaturas a las cuales las especies de *Trichoderma* se han adaptado, se puede considerar que la mayoría de estas presentan como óptimo de temperatura el intervalo entre los 25 a 30° C (Danielson y Davey, citados por Klein y Eveleigh, 1998). Especies como *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma saturnisporum*, parecen tener el óptimo de temperatura más alto (entre 38 y 44° C); *Trichoderma viridae* y *Trichoderma polysporum* con el rango óptimo de temperatura más fresco (entre los 20 a 25° C); y en términos medios, especies como *Trichoderma harzianum* con un rango de temperatura cálido que oscila entre los 22 a 33° C, con una temperatura óptima de 27° C (Danielson y Davey, citados por Kubicek-Pranz, 1998).

Se ha visto que la temperatura es un factor determinante durante el proceso de colonización del hongo, dado que influye cualitativamente y cuantitativamente en dicho proceso; también se ha visto reflejado su efecto

sobre la esporulación de *Trichoderma* (Danielson y Davey, citados por Klein y Eveleigh, 1998).

#### **2.4.2.3 Humedad**

Las especies del género *Trichoderma* presentan diversos comportamientos en lo referente al contenido de humedad en el medio en que se desarrollan. En términos generales se puede decir que este género exhibe un comportamiento que va desde mesófilo a hidrófilo, con respecto a la actividad del agua (Kubicek-Pranz, 1998). La mayoría de las especies de *Trichoderma* pasa de un estado latente a uno activo, a medida que aumenta el contenido de humedad del suelo, desarrollándose óptimamente hasta un 60% de la capacidad de campo del mismo. Estudios realizados por Jackson et al., citados por Kubicek-Pranz (1998) con las especies *Trichoderma virens*, *Trichoderma citrinoviride* y *Trichoderma viridae* exhibieron que las tasas de extensión de las hifas de las tres especies, se redujeron con el aumento de potencial de agua en el rango de -0,7 a -14,0 MPa. El mismo autor trabajando con *Trichoderma harzianum* demuestra que una disminución de la actividad de agua promueve la esporulación del hongo. También se concluye que la germinación de los conidios es particularmente sensible a la creciente presión osmótica. Finalmente, el potencial hídrico también se ha informado en influir en la formación de compuestos volátiles en *Trichoderma viridae* (Kubicek-Pranz, 1998). Otros autores como Danielson y Davey, citados por Klein y Eveleigh (1998), Papavizas, citado por Cabrera y Tejera (2002), reafirman que *Trichoderma harzianum* es relativamente intolerante de los niveles de humedad bajos.

#### **2.4.2.4 pH**

En términos generales, se ha observado que diferentes especies de *Trichoderma* son más frecuentes en los suelos ácidos y ligeramente ácidos. Como regla general se acepta que las diferentes especies crecen muy poco a pH mayor que 7; el crecimiento suele ser óptimo entre pH 4 y 6.5, y sólo unas pocas especies parecen tolerar un pH menor a 3. La concentración de iones de hidrógeno tiene un fuerte impacto en el crecimiento de *Trichoderma*, debido a muchos nutrientes (por ejemplo, azúcares y aminoácidos) atraviesan la membrana plasmática por simporte junto al H<sup>+</sup> (Kubicek-Pranz, 1998). Dentro de los nutrientes, merece especial atención el ión férrico (Fe<sup>3+</sup>), dado que a partir de un pH de 7.5 empieza a tornarse no disponible bajo condiciones alcalinas. Según Cabrera y Tejera (2002) las mejores tasas de crecimiento de *Trichoderma harzianum* ocurren a un pH de 5.5, con reducciones en el crecimiento por debajo de pH 4.1. Estudios de Lejeune et al., citados por

Kubicek-Pranz (1998) demuestran que la formación de conidios en *Trichoderma* no se ve afectada por los cambios en el pH entre 2.2 y 7.6. También se observa que la germinación de los conidios es mayor bajo condiciones ácidas con respecto a las neutras.

#### **2.4.2.5 Oxígeno**

*Trichoderma* es un hongo netamente aerobio obligado, aunque se han aislado algunas cepas en ambientes con una presión parcial de oxígeno muy baja, con buenos desempeños de crecimiento. En consecuencia, varias especies de *Trichoderma* son inhibidas por altas presiones parciales de CO<sub>2</sub>, dependiendo del pH. La inhibición es más fuerte en condiciones de pH neutro y ligeramente alcalino (Danielson y Davey, citados por Kubicek-Pranz, 1998). Un estudio particular de Hutchinson y Cowan, citados por Kubicek-Pranz (1998) reporta un efecto inhibitorio de CO<sub>2</sub> producido por *Trichoderma harzianum*, en el crecimiento y la esporulación de dos hongos fitopatógenos *Aspergillus niger* (que produce un moho negro en varias especies hortícolas) y *Pestalotia rhododendri* (endófito de la familia Ericáceas). También se sugiere que algunas cepas de *Trichoderma* pueden ser más tolerantes a la acumulación de CO<sub>2</sub>, con respecto a otros hongos. En el caso de incorporar a un sustrato *Trichoderma* como agente de biocontrol en la producción de plantines en vivero, es fundamental considerar las características del sustrato en lo referente a una buena aireación, no solo para el hongo, sino también para el sistema radicular del plantín. Utilizando sustratos con baja proporción de la fase sólida (del orden del 15% del peso seco), o sea buena macroporosidad, se asegura un buen intercambio gaseoso en el sistema sustrato-atmósfera tanto del O<sub>2</sub> como del CO<sub>2</sub> producido.<sup>2</sup>

#### **2.4.3 Mecanismos de acción directos de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol**

Los microorganismos antagonistas presentan diversos mecanismos de acción que les permiten ejercer su control sobre las poblaciones de fitopatógenos. Generalmente cada uno de estos antagonistas presenta más de un mecanismo de acción que se involucra en el proceso de control de los patógenos; además esta diversidad de mecanismos de acción, es una característica deseable a la hora de seleccionar un microorganismo como biocontrolador, dado que se disminuye la probabilidad de aparición de razas resistentes de patógenos (Cabrera y Tejera 2002, Mondino y Vero 2006).

Cuando estos mecanismos de acción comprenden una interacción directa entre el sistema patógeno-antagonista, se habla de mecanismos de

acción *directos*. Dentro de la acción biocontroladora del género *Trichoderma*, se diferencian principalmente tres mecanismos de acción directos: micoparasitismo, antibiosis y competencia. Algunos autores reconocen además de los mencionados, otros mecanismos de acción para el género *Trichoderma* tales como: la secreción de enzimas que contrarrestan la acción enzimática del patógeno, y la producción de compuestos inhibidores (Zimand et al., Elad et al., citados por Cabrera y Tejera 2002, Kapt et al., citados por Cárdenas 2003, Mondino y Vero 2006, Harman et al., citados por Infante 2009).

#### **2.4.3.1 Competencia**

La competencia se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización de éste por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. La competencia ocurre, siempre y cuando, haya escasez de algún factor esencial para el desarrollo de los microorganismos involucrados.

Sin dudas, este tipo de mecanismo de acción se ve favorecido por las características intrínsecas del género *Trichoderma*; algunas de las cuales ya se han mencionado directa o indirectamente: alta velocidad de crecimiento y desarrollo, abundante esporulación, gran capacidad de sobrevivir en condiciones muy extremas (tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, presencia de compuestos tóxicos como herbicidas y fungicidas, etc.). Todas estas características referidas al género *Trichoderma*, lo convierten en un excelente competidor por los diversos factores esenciales de crecimiento para los microorganismos, además de ser un eficiente agente de control biológico (Benítez et al. 2004, Infante 2009).

Las interacciones de competencia entre los microorganismos, puede establecerse en base a diferentes factores como ser: espacio físico, luz, oxígeno o nutrientes (Mondino y Vero, 2006).

Uno de los principales factores por cuales los microorganismos compiten es el nicho específico referente a la rizósfera. Debido a los variados exudados radiculares (ricos en nutrientes) que se encuentran en dicha zona, parte de la población microbiana presente en el suelo (entre ellos los fitopatógenos) se ve atraída a ocupar dicho nicho. Para ello, *Trichoderma* cuenta con una gran capacidad de colonización de las raíces y utilización de los exudados radiculares, con el fin de proteger a las raíces del posible ataque de fitopatógenos (Mondino y Vero, 2006). En viveros forestales, la competencia por espacio va a depender fundamentalmente de si el sustrato utilizado está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microflora natural (Infante, 2009).



La competencia por nutrientes puede ser por fuentes de carbono (azúcares y polisacáridos), nitrógeno y microelementos. En viveros forestales cuando se emplean sustratos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz y es irrelevante desde el punto de vista práctico. Sumado a esto, hay que considerar las prácticas de fertilizaciones periódicas que se realizan, y que generan niveles de nutrientes minerales, en los cuales difícil se llegue a establecer competencia entre microorganismos (Mondino y Vero 2006, Infante 2009).

Un caso especial de competencia por minerales ocurre con el nutriente mineral hierro. Es sabido que en la mayoría de los hongos filamentosos, la absorción de hierro es esencial para su crecimiento. En condiciones normales, el hierro se encuentra en suelos y sustratos bajo la forma de ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que es insoluble y poco disponible para los microorganismos. Cuando los niveles de hierro son limitantes, *Trichoderma* tiene la capacidad de liberar al medio unas moléculas de bajo peso molecular, llamadas sideróforos capaces de quelatar al ión férrico, y así incorporarlo (bajo una forma disponible) al interior de sus células (Mondino y Vero 2006, Benítez et al. 2009).

#### **2.4.3.2 Micoparasitismo**

Se entiende como micoparasitismo al proceso por el cual un organismo degrada y asimila hongos. Durante el micoparasitismo se establece una simbiosis antagónica entre organismos, donde el micoparásito coloniza a un hongo vivo, degrada sus paredes celulares, asimila y finalmente se nutre del contenido celular de éste último. Generalmente durante este proceso están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas y celulasas, que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Mondino y Vero 2006, Infante et al. 2009).

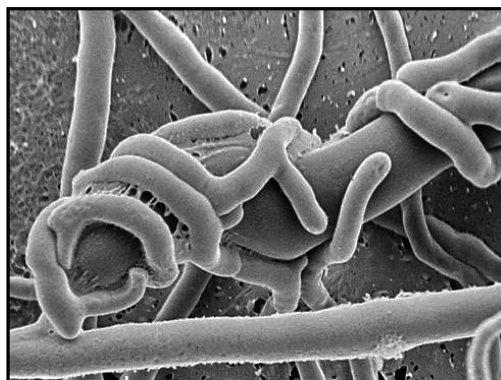
El micoparasitismo es un proceso complejo el cual se divide en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y actividad lítica. El desarrollo de cada una de las etapas depende de los microorganismos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales (Mondino y Vero 2006, Chet y Benhamou, citados por Infante 2009).

**Crecimiento quimiotrófico:** El quimiotropismo positivo es el crecimiento del antagonista en dirección hacia el patógeno, bajo el estímulo de algún compuesto químico. Durante la etapa de localización, *Trichoderma* puede detectar al hospedante a distancia y sus hifas crecer en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico. **Reconocimiento:** El reconocimiento entre el hospedero y el micoparásito se realiza a través de interacciones del tipo

lectinas-carbohidratos, entre las paredes de ambos organismos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular (Chet et al., citados por Infante et al., 2009). El reconocimiento entre cepas de *Trichoderma* y especies de hongos fitopatógenos son efectivas sólo contra patógenos específicos, por lo que el reconocimiento molecular es el evento esencial que precede al proceso antagonista. **Adhesión y enrollamiento:** Una vez que la respuesta de reconocimiento es positiva, el micoparásito se une al hospedero. En el género *Trichoderma* las hifas del micoparásito se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios y se enrollan alrededor de estas (figura 3). **Actividad lítica:** En la última etapa del proceso de micoparasitismo, ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, capaces de degradar las paredes celulares del hongo hospedero, que posibilitan la penetración de las hifas del antagonista. Las especies del género *Trichoderma* excretan enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas) que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de sus propias hifas, que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno. Finalmente el proceso termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante, el cual se presenta con síntomas de disgregación, lo que disminuye la actividad patogénica del mismo.

El micoparasitismo no está restringido solamente a la destrucción de hifas; sino que también se puede dar sobre las estructuras de resistencia de diferentes hongos. Es común encontrar poblaciones naturales de *Trichoderma* colonizando esclerotos de *Sclerotinia sclerotiorum* (Mondino y Vero, 2006).

**Figura No. 3:** Imagen tomada con microscopio electrónico de barrido donde se observa hifas de *Trichoderma* spp. enrolladas sobre una hifa de *Rhizoctonia* spp. (centro) durante el proceso de micoparasitismo (modificado de Science Photo Library, s.f.).



#### 2.4.3.3 Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Dichos compuestos de bajo peso molecular están asociados al metabolismo secundario de los microorganismos antagonistas, y son capaces de inhibir el desarrollo o incluso provocar la muerte de los microorganismos patógenos, actuando a muy bajas concentraciones. Los antibióticos pueden ser de tipo volátiles y no volátiles, pudiendo actuar los primeros sin que haya contacto físico entre los microorganismos involucrados. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un hiperparasitismo de origen enzimático. Como la antibiosis actúa sobre el patógeno atacando un sitio blanco específico, es preferible que no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de razas del patógeno resistentes al antibiótico (Mondino y Vero 2006, Infante et al. 2009).

Para el género *Trichoderma*, se han identificado hasta la fecha más de 180 compuestos con función antibiótica sobre microorganismos. Dentro de los compuestos relacionados a la actividad antagónica de fitopatógenos, se pueden mencionar ácido harzianico, tricholinas, antibióticos de 6-pentil-pirano, massoilactona, gliovirinas, glisopreninas y ácido heptelidico (Vey et al., citados por Benítez, 2004); gliotoxina y viridina (Díaz, citado por Infante et al., 2009);

trichodermina, suzukacilina, alamectina, dermadina y trichotecenos (Martínez, citado por Infante et al., 2009).

#### **2.4.4 Mecanismos de acción indirectos de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol**

Además de los mecanismos de biocontrol directos mencionados anteriormente, *Trichoderma* presenta una serie de mecanismos cuya acción biorreguladora ocurre en forma indirecta sobre los microorganismos patógenos. En dichos mecanismos sucede una interrelación entre el agente de biocontrol y el hospedero, teniendo su efecto en forma indirecta sobre el patógeno. Dentro de los mecanismos indirectos que presenta el género *Trichoderma*, se encuentra el efecto promotor del crecimiento en plantas, la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas y la inducción a la resistencia. Otros autores atribuyen a *Trichoderma* diferentes mecanismos de acción como detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección, la capacidad de crear un ambiente favorable al desarrollo radicular lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Cárdenas 2003, Harman, citado por Infante et al. 2009).

##### **2.4.4.1 Efecto promotor del crecimiento en plantas**

Diferentes especies pertenecientes al género *Trichoderma* presentan una relación simbiótica con las raíces de plantas, que determinan un aumento considerable en el crecimiento de las mismas. En la actualidad existen numerosos trabajos realizados con varias especies de interés agrícola, que demuestran el efecto biopromotor sobre del crecimiento de estos cultivos al agregarle diferentes cepas de *Trichoderma*. Para una revisión exhausta de estos trabajos se puede consultar diferentes autores como: Bailey y Lunsden (1998), Cárdenas (2003), Añon et al. (2004).

También existen algunos trabajos en lo referente al aumento del rendimiento del género *Pinus* en viveros forestales, debido a la inclusión de formulados comerciales en base a cepas de *Trichoderma*. Añon et al. (2004) trabajando con plantines de *Pinus taeda*, con diferentes dosis de fertilización y la inclusión o no de *Trichoderma harzianum* cepa L1, concluyen que los plantines inoculados presentan una altura mayor del 24%, con respecto a los no inoculados. A su vez, los plantines inoculados exhiben un diámetro de cuello un 15% mayor, con respecto a los sin inocular; un 49% más en materia fresca y un 38 % más en materia seca, en referencia a los sin inocular. Estudios similares realizados por Negrone et al. (2008) con la misma especie forestal y diferentes

dosis de inoculación de *Trichoderma harzianum* cepa L1, presentan algunos comportamientos disímiles en los parámetros estudiados por Añon (2004), pero llegan a la conclusión que la inoculación no tuvo un efecto biopromotor en el crecimiento de los plantines. Finalmente un estudio realizado por Donoso et al. (2008) con plantines de *Pinus radiata*, utilizando diferentes sustratos y aplicación o no de *Trichoderma harzianum* cepa Queule mediante fertirrigación, llega a las conclusiones de que la aplicación de *Trichoderma harzianum* tuvo influencia significativamente mayor, sólo en la variable área radicular, pero fue indiferente a la altura del plantín, biomasa aérea y total, y peso seco de las raíces.

La actividad simbiote entre las raíces y cepas de *Trichoderma* resulta en una mejora del crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta mejoría se ve reflejada por un aumento en el desarrollo de la masa radicular, con un aumento de la formación de pelos radiculares y mayor profundidad de enraizamiento. Durante el proceso de simbiosis entre la planta y *Trichoderma*, las hifas del hongo deben colonizar a la planta antes de estimular su crecimiento y/o proteger las raíces contra el ataque de fitopatógenos. El proceso de colonización implica la capacidad de adherirse y reconocer las raíces de las plantas, penetrar en la planta, y soportar metabolitos tóxicos producidos por ella en respuesta a la invasión de un organismo extraño, ya sea patógeno o no. Las plantas reaccionan contra la invasión de hongos mediante la síntesis y acumulación de fitoalexinas (dentro de las cuales se encuentran las peroxidadas, sección 2.4.4.4), flavonoides y terpenoides, derivados fenólicos, agliconas y otros compuestos antimicrobianos (Benítez et al. 2004, Harman 2006).

Si bien no se conoce con exactitud los procesos por el cual *Trichoderma* estimula el crecimiento vegetal, se ha identificado algunas cepas que producen fitohormonas (auxinas, citoquininas y etileno) con poder inductor. Dentro del grupo de las citoquininas se ha identificado a la zeatina, y en las giberelinas a GA3 y grupos relacionados a esta última (Arora et al., citados por Benítez et al., 2009).

#### **2.4.4.2 Solubilización de nutrientes minerales**

Muchos de los microorganismos que colonizan y penetran los tejidos de las raíces de las plantas se han identificados en la participación de la solubilización de nutrientes minerales, que se encuentran bajo formas poco o no disponibles para las plantas. Este mecanismo podría explicar, al menos en parte, el efecto de los microorganismos en la promoción del crecimiento vegetal debido al resultado de la biofertilización (Altomare et al. 1999, Benítez et al.

2004). Algunas cepas de *Trichoderma harzianum* son el fiel reflejo de las mencionadas interacciones microbianas con raíces de plantas, donde con frecuencia se mejora la captación y asimilación de nutrientes en el sistema antagonista-planta.

La capacidad que poseen ciertas cepas de *Trichoderma harzianum* en solubilizar la más variada gama de nutrientes, se han fundamentado en tres posibles mecanismos: la acidificación del medio, la producción de metabolitos de quelación, y la actividad redox; que es de esperar, actúen en conjunto aunque sea para un mismo nutriente (Altomare et al. 1999, Benítez et al. 2004).

El fósforo en la solución del suelo (el disponible para las plantas), se encuentra en muy bajas concentraciones debido a que forma complejos fosfatados insolubles del tipo P-Al, P-Fe y P-Ca, los cuales no pueden ser absorbidos por las plantas. Sin embargo, el fosfato de calcio insoluble puede ser disuelto y puesto a disposición de las plantas por los microorganismos de la rizósfera, a través de un mecanismo que se cree que implica la liberación de ácidos orgánicos por parte de estos últimos (Cunningham y Kuiack, citados por Altomare et al., 1999). Cepas de *Trichoderma harzianum* son capaces de acidificar su entorno debido a la secreción de ácidos orgánicos derivados principalmente del metabolismo de la glucosa, y otras fuentes de carbono, y así solubilizar fosfatos, y cationes minerales como el hierro, manganeso y magnesio (Harman et al., citados por Benítez et al., 2004).

En un trabajo realizado por Altomare et al. (1999), se estudió la capacidad de *Trichoderma harzianum* cepa T-22 de solubilizar *in vitro*  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  y Zn metálico mediante la liberación de diferentes compuestos orgánicos como el ácido oxálico, ácido cítrico, ácido málico, ácido succínico, ácido láctico y ácido fumárico. En este estudio los autores concluyen que la acidificación no es un mecanismo de solubilización ya que el pH de los medios de cultivos nunca cayó por debajo de 5.0, lo necesario para solubilizar los diferentes complejos.

En la sección 2.4.3.1 ya se ha tratado el rol de algunos microorganismos de la microflora del suelo, en la interacción entre el mineral hierro y su absorción por parte de las plantas. Es sabido que bajo condiciones restrictivas de hierro, ciertos microorganismos liberan al medio metabolitos con alta capacidad de quelatación del ión  $\text{Fe}^{3+}$ . Por su parte, el manganeso puede ocurrir naturalmente en los suelos en varios estados de oxidación, pero se encuentra disponible para las plantas sólo en la forma reducida ( $\text{Mn}^{2+}$ ), siendo insolubles los estados de oxidación mayores a éste. El estado de oxidación del manganeso en el suelo depende de las condiciones del mismo (valores de pH inferiores a 6 favorecen la reducción y valores por encima de 6.5 favorecen la

oxidación) y de la actividad de los microorganismos de la rizósfera, que pueden oxidar o reducir el manganeso, y por lo tanto influir en su disponibilidad (Huber y McCay-Buis, citados por Altomare et al., 1999).

En el mismo trabajo citado anteriormente (Altomare et al., 1999) se concluye que la cepa T-22 produce sideróforos capaces de complejizar al hierro en quelato-Fe pero no al manganeso; por lo que dicho proceso interviene al menos parcialmente en la solubilización del hierro.

En el proceso de asimilación de iones metálicos por parte de los microorganismos, se ha encontrado que a menudo participan mecanismos enzimáticos reductores (actividad redox). Por ejemplo, el hierro para ser absorbido por las plantas debe ser previamente reducido de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . La absorción de hierro por las raíces se cree que es regulada por la actividad de un sistema de membrana plasmática redox, es decir, el quelato- $\text{Fe}^{3+}$  reductasa, que reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  a quelatos de  $\text{Fe}^{2+}$ . El quelato- $\text{Fe}^{3+}$  reductasa también parece ser capaz de reducir otros metales como  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , y su actividad es estimulada por condiciones de deficiencia de hierro y cobre (Norvell et al., citados por Altomare, 1999).

En el trabajo de Altomare et al. (1999) se demuestra que la cepa T-22 produce metabolitos difusibles capaces de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ . Finalmente los autores trabajan en la solubilización del zinc metálico por intermedio de la cepa T-22. El estado de oxidación estable del zinc es  $\text{Zn}^{2+}$ , que es la forma requerida por las plantas y hongos. Por lo tanto, la solubilización del zinc metálico (estado de oxidación 0) depende de su oxidación a  $\text{Zn}^{2+}$ . La cepa T-22 demostró tener la capacidad de acelerar la disolución oxidativa de zinc metálico, liberando  $\text{Zn}^{2+}$ . En este caso, el efecto de *Trichoderma harzianum* puede incluir la liberación de complejos ligantes que secuestran  $\text{Zn}^{2+}$ , lo que aumenta la disolución de zinc metálico.

#### **2.4.4.3 Inducción de resistencia**

Según Agrios (2004), la resistencia se define la capacidad de un organismo para excluir o superar, por completo o en algún grado, el efecto de un agente patógeno o factor perjudicial de otro tipo. En plantas se diferencian dos tipos de resistencia: la resistencia constitutiva o preformada, y la resistencia inducida. A cada uno de los tipos de resistencia se los puede dividir, a su vez, en estructural y bioquímica. En términos generales, dentro de la resistencia constitutiva estructural se encuentran: deposición de cera y cutícula sobre células de la epidermis, modificación de la estructura de las paredes celulares por la acumulación de ciertos materiales (lignina, callosa, suberina, gomas,

cutina, glicosidos fenólicos, fenoles, quinonas, esteroides, glicoalcaloides, terpenoides y tioninas), tejidos con paredes celulares gruesas, tamaño, localización y forma de los estomas y tricomas. En la resistencia constitutiva se diferencian los siguientes componentes bioquímicos: fitoanticipinas (compuestos antimicrobianos preformados de las fitoalexinas), lectinas, proteínas inhibidoras de poligalacturonasas, quitinasas y glucanasas. Por su parte, dentro de la resistencia inducida, para el caso de los componentes estructurales de diferencian: reacción de defensa citoplasmática, estructuras celulares de defensa (engrosamiento y compactación de la pared celular, deposición de calosa y lignificación), estructuras histológicas de defensa (formación de corcho, capas de abscisión, tílides), y reacción de hipersensibilidad. Finalmente en los componentes bioquímicos, se reconocen: la producción de fitoalexinas, especies reactivas de oxígeno, radicales libres, iones calcio, siliconas y silicatos, polifenoloxidasas, peroxidasas y las proteínas relacionadas a la patogénesis.<sup>3</sup>

En base a los estudios realizados sobre la herencia entre variedades resistentes o susceptibles de hospederos, y razas virulentas o avirulentas de patógenos, se ha llegado a la conclusión de que para cada gen resistente en las plantas (gen R) existe un gen específico complementario de avirulencia (gen *avr*) en el fitopatógeno. Basándose en estos estudios de han identificado dos posibles tipos de interacciones entre planta-patógeno. Por un lado se encuentran las relaciones incompatibles, que se refieren a una interacción entre una planta resistente (portadora del gen R) y un patógeno avirulento (portador del gen *avr*); en este caso la planta cuenta con la información genética capaz de activar los mecanismos de defensa que impiden el desarrollo de la enfermedad. El otro tipo de relaciones son las compatibles, que se establecen cuando una planta susceptible (no portadora del gen R) interactúa con un patógeno virulento (no portador del gen *avr*); en este caso, la planta no cuenta con la información genética necesaria para activar los mecanismos de defensa (o sí cuenta, pero se activan retrasadamente) y se origina la enfermedad (Agrios, 2004).

Para el caso de las interacciones planta-patógeno donde se desencadena una enfermedad, dicho acontecimiento podría ser evitado si los mecanismos de resistencia que presenta una planta fuesen activados a tiempo. Se habla de resistencia inducida cuando una planta que es estimulada adecuadamente, expresa sus mecanismos de resistencia en respuesta a dichos estímulos (Mondino y Vero, 2006).

---

<sup>3</sup> Galeano, P. 2010. Resistencia inducida en plantas; bases moleculares y su importancia en el Control Biológico. In: Curso Control Biológico de Patógenos de Plantas (2010, Montevideo). Textos. Montevideo, Facultad de Agronomía. 29 p. (sin publicar).



Los mecanismos de resistencia inducida a enfermedades pueden ser clasificados en función del tipo de inductor, el tipo de respuesta y el tipo de señal que coordina la respuesta de resistencia a distancia, en dos grupos: la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR), (Hammerschmidt, citado por Mondino y Vero, 2006).

En la resistencia sistémica adquirida se han identificado inductores de la más variada naturaleza química, entre los cuales se pueden encontrar inductores de tipo exógenos y endógenos, dependiendo de como son producidos. Para el caso de inductores endógenos, el origen es parasitario o producido por algún agente físico externo. A su vez, este tipo de inductores se subclasifica en bióticos y abióticos. Los inductores endógenos se asocian con fragmentos celulares liberados desde la pared celular de la planta (por ejemplo polisacáridos, proteínas o peptidoglucanos), derivados del resultado de las interacciones primarias con el patógeno. De esta forma la resistencia sistémica adquirida se puede activar por: la infección de patógenos que ocasionen una lesión necrótica localizada, por repuesta de hipersensibilidad, ácido salicílico, ácido 2,6-dicloroisonicotínico, acibenzolar-S-metil (Walters y Heil, 2007), sales de fosfatos o sílice (Mondino y Vero, 2006). Hoy en día, todos estos inductores son llamados PAMPs (por sus siglas en inglés de patrones moleculares asociados a patógenos). La percepción de las moléculas inductoras por la planta huésped resulta en la activación de una vía de señalización, en donde los PAMPs se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que operan en la transducción de la señal y en la activación de genes de la célula vegetal, comprometidos en las tareas de defensa (Walters y Heil, 2007). También se sabe que el comienzo de SAR está asociado con niveles elevados de ácido salicílico a nivel local y sistémico y con la expresión de un conjunto específico de genes que codifican proteínas relacionadas a la patogénesis (PR). La activación de la expresión de genes PR y SAR depende de la transducción de la señal de ácido salicílico y ésta, a su vez, es dependiente del regulador transcripcional NPR1 (Walters y Heil 2007, Van Wees et al. 2008). Si bien al día de hoy no está totalmente clara la naturaleza de la señal difusible desde que una planta reconoce a los PAMPs, hasta que se activan los genes correspondientes a la defensa, se sabe que hay un aumento de la concentración intracelular de iones  $H^+$  y  $Ca^{2+}$ , mientras disminuye la de  $Cl^-$  y  $K^+$ . Este intercambio de iones es un prerrequisito para la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de la generación de especies reactivas de oxígeno (vistas en la sección 2.5.4.4) a través de una NAD(P)H oxidasa asociada a membrana. Una vez activadas las MAPK, algunas son traslocadas al núcleo y otras son rápidamente fosforiladas y esfosforiladas (Vojnov et al., 2010).

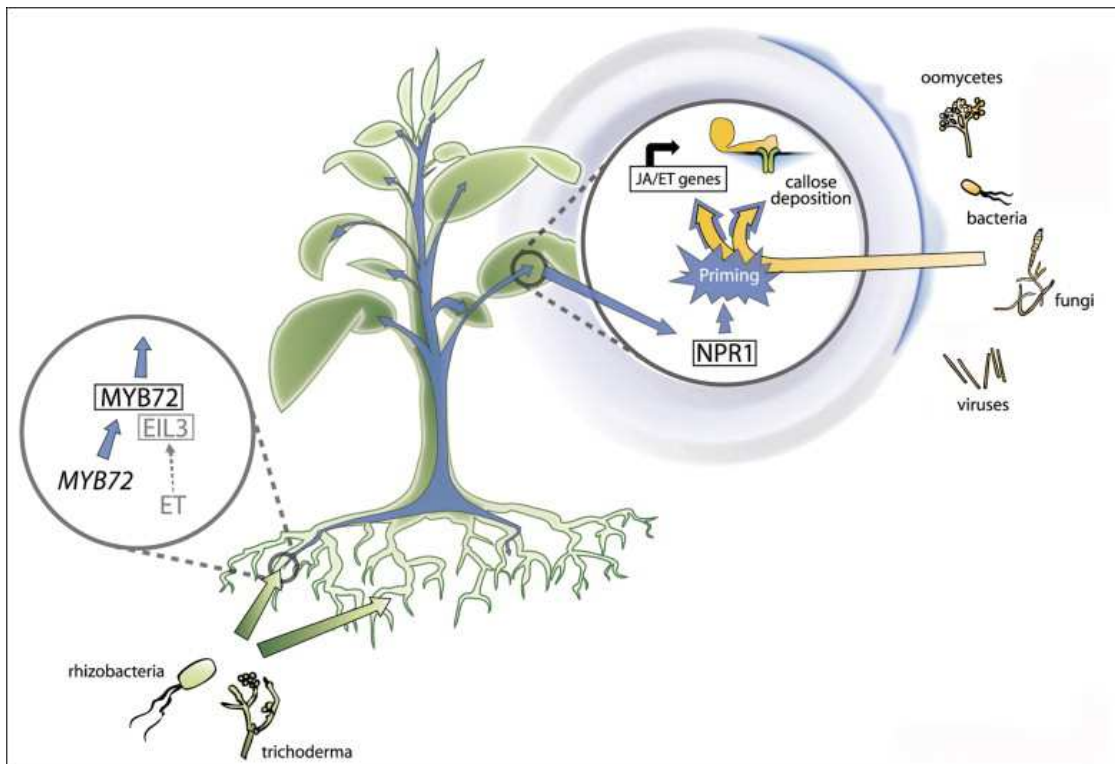
La inducción por SAR genera una señalización caracterizada por la expresión de genes PR de forma local como sistémica, dando protección a diferentes órganos de la planta; generalmente es contra un amplio espectro de patógenos, incluyendo hongos, bacterias y virus, con un efecto de larga duración.<sup>3</sup>

Por otro lado, la resistencia sistémica inducida (ISR) es activada por diferentes microorganismos estrechamente relacionados o en asociación con los tejidos de las raíces de la planta. En esta asociación microorganismo-planta se han identificado principalmente a rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGRP), como las principales especies activadoras de ISR. Las bacterias PGPR mejores caracterizadas, corresponden a las cepas de varias especies de *Pseudomonas* no patogénicas para el sistema de raíces de las plantas. Asimismo, se han realizado numerosos trabajos que identifican a cepas del género *Trichoderma*, también como posibles inductores de la defensa en la planta (Bailey y Lunsden 1998, Benítez et al. 2004, Van Wees et al. 2008).

La ISR es activada por múltiples moléculas en esta interacción microorganismo-planta, las cuales se reconocen con el nombre de patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs). Entre estas moléculas se encuentran la quitina, celulosa, xylanosas, flagelina, lipopolisacáridos, sideróforos, hidrofobina y N-acyl-L-homoserine lactone (molécula que actúa como sensores de quórum en ciertas bacterias) (Van Wees et al. 2008, Vojnov et al. 2010). Los antibióticos que son producidos por algunos microorganismos beneficiosos, también pueden actuar como MAMPs en el desencadenamiento de la respuesta inmune (Van Wees et al., 2008). Los MAMPs son percibidos por los RRP (citados anteriormente para SAR) que se encuentran en la membrana plasmática de la célula vegetal (Vojnov et al., 2010).

Estudios realizados en *Arabidopsis* demuestran que la respuesta de defensa de la planta esta controlada por una red de señalización, en la que las fitohormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) juegan un papel importante. Hay amplia evidencia de un entrecruzamiento de las vías JA y ET, lo que permite que las plantas ajusten finamente su respuesta de defensa, en función del invasor encontrado. Durante la regulación de la defensa, se ha observado un aumento de la producción de estas dos hormonas, lo que conlleva a la activación de los distintos conjuntos de genes relacionados con la defensa (Walters y Heil 2007, Van Wees et al. 2008). A diferencia de SAR, la ISR no es dependiente de la acumulación de la hormona ácido salicílico; y también se ha observado que en algunos casos esta asociada con la expresión de genes PR, pero en otros casos no es dependiente de dichas proteínas (Hoffland et al., citados por Walters y Heil 2007, Van Wees et al. 2008).

**Figura No. 4:** Modelo para la vía de señalización de ISR en *Arabidopsis*, donde se muestra la relación entre los factores de transcripción NPR1, MYB72 y EIL3, las hormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) y la potenciación sistémica de la defensa (modificado de Wan Wees et al., 2008).



Los mismos estudios en *Arabidopsis* confirmaron que ISR esta bajo control del regulador transcripcional NPR1 (al igual que SAR), y que el mismo esta integrado y responde a las diferentes vías de defensa dependientes de las hormonas mencionadas (Pieterse et al., citados por Walters y Heil 2007, Wan Wees et al. 2008). Análisis de un subconjunto de genes referidos a la respuesta de defensa en *Arabidopsis*, demostraron que el factor de transcripción MYB72 se requiere en los primeros pasos en la señalización de ISR. Asimismo, se supone que MYB72 actuaría ligado con otro componente de señalización, el cual corresponde al factor de transcripción EIL3 (figura 4). En *Arabidopsis*, la ISR mediada por rizobacterias se asocia a menudo con la potenciación sistémica de la defensa (Priming), mediante la expresión de genes de respuesta de JA / ET y el depósito elevado de calosa en el lugar de entrada de patógenos (Van Wees et al., 2008). Esta respuesta de defensa no es activada directamente, pero ante el ataque de patógenos la planta responde más rápidamente.<sup>3</sup>

Fenotípicamente ISR es similar a SAR ya que actúa en forma inespecífica contra patógenos taxonómicamente diferentes (Walters y Heil, 2007).

#### **2.4.4.4 Peroxidasas en la respuesta de defensa**

Las peroxidasas son un conjunto de enzimas correspondientes al grupo de las oxidorreductasas, que se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. Estas enzimas son formadas dentro de los organelos peroxisomas, y tienen como función catalizar la oxidación de ciertos compuestos dadores de hidrógeno (por ejemplo fenoles y aminas aromáticas indoles y sulfonatos) utilizando como sustrato común a peróxidos (incluyendo el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ ) que actúan como aceptores de electrones. Las peroxidasas presentan múltiples formas isoenzimáticas que difieren tanto en la estructura primaria de la proteína, como en sus propiedades químicas.

Las peroxidasas se pueden clasificar en dos superfamilias en función de sus diferencias estructurales: la superfamilia de las peroxidasas animales y la superfamilia de las bacterias, hongos y plantas. Esta última superfamilia se puede dividir a su vez en tres clases: la clase I incluye la peroxidasa del citocromo *c* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (que interviene en la cadena de transporte de electrones mitocondrial), las peroxidasas de ascorbato de las cianobacterias, las algas y las plantas, y las catalasas/peroxidasas de las bacterias y de los hongos. La clase II comprende a las peroxidasas extracelulares de los hongos ligninolíticos, como la lignina peroxidasa y las peroxidasas dependientes de  $Mn^{+2}$  (magnesio peroxidasa). La clase III incluye las peroxidasas de secreción de las plantas, que participan en diversos procesos fisiológicos relevantes tales como resistencia a patógenos, fitorremediación por degradación (oxidación) de compuestos tóxicos, acción antioxidante, degradación de la lignina, catabolismo de auxinas, biosíntesis del etileno, así como también en diversos mecanismos frente a condiciones de estrés (Hansberg, 2002).

Varios estudios han identificado a enzimas peroxidasas como integrantes de las complejas vías de señalización intercelular de resistencia inducida en plantas. Por un lado las peroxidasas actúan como proteínas relacionadas a la defensa (proteínas PR), participando en la respuesta hipersensitiva de SAR, donde esta reacción hipersensitiva es utilizada por la planta como una estrategia de defensa, en la que las células vecinas a la infección entran a la muerte celular programada para eliminar la fuente más inmediata de energía y nutrientes para el microorganismo invasor (Camarena,

2006). También se las han implicado en la transducción de señales en la vía del ácido salicílico, mencionado anteriormente para SAR. Por otro lado, en ISR las peroxidasas intervienen también en las complejas vías de señalización entre el ácido jasmónico y el etileno.

Hasta aquí se ha mencionado el rol de las peroxidasas relacionado con la activación de ciertos genes que codifican para enzimas PR, pero también se sabe que desempeñan una función que no está directamente relacionada con la inducción de la resistencia en la planta, pero que contribuyen a la respuesta de defensa en la misma. Este es el caso de la regulación del metabolismo de especies reactivas de oxígeno, por parte de las enzimas peroxidasas (Díaz et al., 2010). Uno de las más rápidas reacciones de defensa en las plantas frente al ataque de patógenos es la explosión oxidativa, la que conduce a la producción transitoria de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (EROs). Según Díaz et al. (2010) las EROs desempeñarían al menos tres funciones en la defensa de la planta: (i) crean el ambiente apropiado que promueve el proceso de lignificación y la formación de puentes cruzados en la pared celular (lo que las torna más resistentes al ataque de enzimas fúngicas), (ii) poseen también una acción tóxica directa sobre el patógeno frenando su crecimiento, y (iii) sirven como moléculas señales para inducir la expresión de algunos genes relacionados a la defensa.

Actualmente se sabe que la generación de EROs ocurre en dos fases, una inicial, que sucede minutos después de la adición de un patógeno, y una secundaria, que comienza de una a tres horas después que la fase inicial ha terminado. Aunque ambas fases involucran sustratos y vías de inducción similares, las dos fases se regulan de manera independiente. Esto se debe a que la fase I es una reacción biológicamente no específica que involucra patógenos incompatibles, mientras que la fase II del estallido depende de la expresión *avr* en la interacción patógeno-planta y la expresión del grupo de genes involucrados en la respuesta hipersensitiva (Levine et al., citados por Camarena, 2006).

Estas especies son derivados del  $O_2$  y son más reactivos que éste en su estado basal de triplete y además, están parcialmente reducidas. Dichas EROs corresponden al superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) (Hansberg 2002, Camarena 2006).

El  $O_2^-$  se forma cuando el  $O_2$  capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte (aproximadamente el 1%) de los electrones que pasan por la cadena respiratoria salen de ésta y son captados por el  $O_2$ . Esto sucede principalmente a nivel de la semiubiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). Además

de la mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplasmático y de la membrana nuclear también pueden generar  $O_2^-$ . La superfamilia de hemoproteínas correspondientes a los citocromos P450 puede generar  $O_2^-$ . Algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, y algunas peroxidasas inespecíficas también producen  $O_2^-$ . El anión  $O_2^-$  es el radical menos reactivo de los tres considerados, debido a que no posee la capacidad de atravesar la membrana plasmática y es dismutado rápidamente a  $H_2O_2$ . Sólo reacciona a un nivel considerable con las quinonas, los fenoles, el hierro libre o unido a algunas proteínas (por ejemplo los centros Fe-S), afectando la actividad de las enzimas que contienen estos metales y también con otros radicales (el propio  $O_2^-$ , el óxido nítrico y los radicales fenoxi). El  $O_2^-$  inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa lo que afecta la reducción del  $NAD^+$  y el ciclo de Krebs. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, la deshidratasa del dihidroxiácido, la reductasa de ribonucleótido que genera los bifosfato de desoxirribonucleósidos para la síntesis del ADN. También el  $O_2^-$  reduce el  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  y reacciona con el ascorbato (Hansberg 2002, Camarena 2006). La rápida generación del anión  $O_2^-$  o su producto de dismutación  $H_2O_2$  se han reportado en el inicio de SAR, en muchos estudios de respuesta hipersensitiva con bacterias y hongos avirulentos o con patógenos virales (Mehdy, citado por Camarena, 2006).

La mayor parte del  $H_2O_2$  o agua oxigenada proviene de la dismutación del  $O_2^-$ , aunque también algunas oxidasas lo producen como las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles, entre otras. El  $H_2O_2$  es una molécula poco reactiva y puede difundir alguna distancia desde su punto de producción a través de los compartimentos celulares, aunque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. A pesar de ser una molécula poco reactiva, es tóxica debido principalmente a que genera  $^1O_2$  y  $OH^-$ . Reacciona poco con el ascorbato y no reacciona con compuestos como el NAD(P)H, el ADN, los lípidos, o la mayoría de las proteínas. El  $H_2O_2$  puede inactivar algunas enzimas oxidando los grupos tiol; por ejemplo, la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato de la glucólisis, o la fosfatasa de fructosa-1,6-difosfato del cloroplasto. Tanto la Cu-Zn superóxido dismutasa y la Fe-superóxido dismutasa pueden inhibirse por el  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  reacciona lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el  $\alpha$ -cetoglutarato. En muchas células se generan modificaciones en las bases del ADN cuando se les añade  $H_2O_2$ . Esto se debe en gran parte a los metales de transición, fundamentalmente el  $Fe^{2+}$ , que se encuentran unidos al ADN y que en presencia del  $H_2O_2$  generan  $OH^-$  que modifica las bases del mismo (Hansberg 2002, Camarena 2006). Después del reconocimiento de un patógeno, la generación del  $H_2O_2$  puede inhibir el desarrollo del mismo mediante el fortalecimiento de las paredes celulares de la célula huésped,

debido a que produce enlaces cruzados de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y la unión de compuestos fenólicos en la pared celular que pareciera tienen un efecto microbicida (Métraux et al. 2002, Bradley et al., Wu et al., citados por Camarena y de la Torre 2007). Todas estas alteraciones en la estructura de la pared celular después de la infección por un patógeno, pueden contribuir a la resistencia, ya sea deteniendo el ingreso del mismo directamente o disminuyendo el proceso de penetración, permitiendo que la planta active después sus mecanismos de defensa. Según Peng y Kuc, citados por Camarena (2006) la adición de  $H_2O_2$  inhibe la germinación de esporas de numerosos hongos patógenos; también se ha propuesto que la síntesis de proteínas PR puede inducirse artificialmente inyectando  $H_2O_2$  en las hojas de las plantas. De esta manera el  $H_2O_2$  actúa como una señal para inducir un rango de respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares dentro de células y plantas. Dado que el  $H_2O_2$  se produce en respuesta a una variedad de estímulos, es probable que sea un mediador entre diferentes vías metabólicas; a pesar de que su vida media es sólo de 1 milisegundo (lo que la excluye de ser una señal móvil que induce las respuestas de defensa en tejidos sistémicos), se necesita de un sistema de amplificación de la señal de  $H_2O_2$  y se ha propuesto que el ácido salicílico juega el papel agonista durante la respuesta hipersensitiva (Van Camp et al., citados por Camarena y de la Torre, 2007).

El radical  $OH^\cdot$  se forma a partir del  $H_2O_2$ , cuando éste último acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^+$ , el cual se fragmenta y forma el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el ión hidroxilo  $OH^-$ . El radical  $OH^\cdot$  es uno de los compuestos más reactivos que existen. El  $OH^\cdot$  casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente, y lo hace prácticamente con cualquier biomolécula en el sitio en donde se produce, debido a que las células no tienen mecanismo enzimático para eliminarlo. El  $OH^\cdot$  puede atacar tanto las purinas como las pirimidinas, así como la desoxirribosa y además generar rupturas en el ADN. La mayoría de daños en las proteínas son ocasionados por el  $OH^\cdot$ . Éste reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. La deshidrogenasa del glutamato dependiente del NADPH se inactiva cuando es oxidada por un  $OH^\cdot$  que se forma por la reacción del  $H_2O_2$  con un hierro unido a su sitio alostérico. Los daños producidos por el  $OH^\cdot$  son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación (Hansberg 2002, Camarena 2006). Se ha observado que la oxidación de los lípidos de membrana por radicales libres, puede matar a las células directamente y tener un efecto directo en la actividad antimicrobiana. De esta manera, los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares, son vulnerables al ataque del radical libre  $OH^\cdot$  mediante la peroxidación lipídica. Éste proceso consiste en una reacción en cadena que comienza cuando los metilenos entre dos dobles enlaces pierden

fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico) que es sustraído por el  $\text{OH}^\cdot$ , y mediante una sucesión de reacciones, finalmente se generan muchos lipoperóxidos. Los lipoperóxidos se pueden reducir mediante glutatión peroxidasa de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A2, que aumenta durante la tensión oxidativa (Hansberg, 2002). Según Vivianco et al. (2005) las complejas vías de señalización en ISR, además de comprender a las hormonas etileno y jasmonato (como ya se mencionó), se ha identificado como componentes primarios de emisión de la señal a derivados de ácidos grasos (aldehídos volátiles) formados por peroxidación lipídica y escisión de la cadena alifática llamados “volátiles C6”. Según Métraux et al. (2002) la formación de radicales fenólicos en la pared celular mencionados anteriormente, está implicado en el proceso de peroxidación lipídica y puede activar la expresión de genes de defensa.



### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

El ensayo se realizó en las instalaciones del vivero forestal “*La Buena Unión*” perteneciente a la empresa Terrasys SRL, localizado a la altura del 456Km de la ruta nacional No. 5 Brigadier General Fructuoso Rivera (latitud 31°15'22", longitud 55°37'2"), próximo a la intersección de la ruta No. 30; ubicado en el parador Buena Unión, departamento de Rivera. El período comprendido durante el ensayo corresponde a seis meses (de enero a junio) del año 2010, para plantines de plantación de invierno.

El vivero cuenta con instalaciones de buen desarrollo tecnológico, que incluyen el invernáculo donde se desarrolla el ensayo. La superficie del mismo es de aproximadamente unos 1000 m<sup>2</sup>, cuya estructura esta compuesta por caños galvanizados, una cubierta de polietileno transparente con filtro para rayos ultravioletas, malla media sombra y cubiertas laterales que permiten su levantamiento. Los caminos internos están formados por hormigón y se cuenta con un sistema de soporte tipo mesas fijas de maderas, las cuales poseen unos rieles para posicionar y movilizar las bandejas de producción. Toda la superficie cuenta con un sistema de irrigación del tipo carro móvil con aspersion aérea.

**Figura No. 5:** Ensayo instalado en el interior del invernáculo.



Se utiliza la especie *Pinus taeda*, donde la semilla es local de Rivera y cosechada de un rodal semillero de 11 años de edad, con procedencia del país Zimbabue, pero con origen desconocido. Las semillas previo a la siembra son

desinfectadas con hipoclorito y tratadas con curasemillas de formulación Disulfuro de tetrametil thiuram (TMTD).

El sustrato utilizado consiste en una mezcla compuesta por 50% de corteza de pino compostada de origen argentino y 50% de turba rubia de musgo (*Sphagnum*) de granulación fina, con origen canadiense (nombre comercial PRO-MOSS fine<sup>®</sup>, de la empresa Premier). A la mezcla del sustrato se le incorporó dos semanas antes de la siembra, el fungicida orgánico Trichosoil<sup>®</sup> a razón de 2 kg/m<sup>3</sup> de sustrato. Trichosoil<sup>®</sup> es un fungicida biológico registrado por la empresa LAGE y Cía. S.A. que tiene una formulación en polvo seco, que presenta como sustancia activa la cepa nativa *Trichoderma harzianum* cepa L1. El formulado comercial se compone en un 58,8% por la misma cepa (mínimo 5x10<sup>8</sup> ufc/ g de producto) y el restante 41,2% corresponde a materiales inertes. Una vez incorporado Trichosoil<sup>®</sup> al sustrato, este se recubre con una lona durante dos semanas para permitir la esporulación del antagonista. Pasadas las dos semanas, el sustrato queda pronto para rellenar las bandejas.

Las bandejas utilizadas en el ensayo son de forma rectangular, de material plástico PVC, las cuales contienen 72 celdas fijas (12x6) con un volumen individual de 96 cm<sup>3</sup>. La forma de las celdas es de pirámide truncada invertida y poseen paredes rectas con una costilla antiespiralamiento de las raíces por pared. El arreglo especial de las celdas dentro de la bandeja presenta un diseño en el cual dos celdas contiguas están separadas por un pequeño hueco que permite una cierta cantidad mínima de espacio de crecimiento para los plantines. Como las bandejas son reutilizables, antes de su uso se tratan con fungicida cúprico.

La siembra de las semillas se comienza el día 4 de enero del 2010, llevándose a cabo con una sembradora automática que deposita en promedio 1,1 semillas por celda. Una vez finalizado el proceso de siembra, las bandejas se recubren con una delgada capa de vermiculita, que permite a la semilla estar físicamente retenida en la cavidad (sito de siembra), y a la vez evitar el crecimiento excesivo de algas y musgo, los cuales pueden retrasar o inhibir completamente su germinación.

La incorporación de nutrientes minerales se realiza mediante fertirrigación, en base a las tres etapas del ciclo productivo presentadas en la sección 2.2.1, y se resumen en el cuadro 8.

**Cuadro No. 8:** Resumen del programa de fertilización de los plantines durante el ciclo de producción en el vivero.

Fase	Fecha inicio post siembra (días)	Concentración de nutrientes N-P-K (*)	Proporción de N-P-K
<b>Establecimiento</b>	15	18-44-44-0 + micronutrientes	1 : 2 : 0
<b>Crecimiento rápido</b>	35	18-18-18-18 + nitrodoble + micronutrientes	2 : 1 : 1
<b>Endurecimiento</b>	60	0-52-34 alternado con 18-18-18-18 + micronutrientes	0 : 2 : 1 1 : 2 : 1

(\*) Concentraciones expresadas en porcentaje en sus equivalentes a N: N total, P: P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K: K<sub>2</sub>O.

### 3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis estadístico del experimento se trabaja con el modelo lineal con medidas repetidas en el tiempo, con un diseño de parcelas divididas y estructura DCA. En el diseño de parcelas divididas se asocian a la parcela mayor los tratamientos y a la parcela menor el tiempo. Se considera una estructura DCA ya que hay un manejo homogéneo dentro del sistema de producción de los plantines como ser: riego, fertilización, sustrato utilizado y procedencia de las semillas. Esto trae como resultado que las unidades experimentales (bandejas) sean todas homogéneas y se haya optado por la mencionada estructura de diseño experimental. Dentro de la unidad experimental, se considera 10 repeticiones en cada una de las variables estudiadas.

$$\text{Modelo estadístico: } Y_{ij} = \mu + I_i + T_j + (IT)_{ij} + \bar{\delta}_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2$$

$$j = 1, 2, 3$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variables aleatorias en estudio: altura parte aérea (cm), diámetro altura de cuello (mm), peso fresco plantín (g), peso fresco parte aérea (g), peso fresco raíz (g), peso seco plantín (g), peso seco parte aérea (g), peso seco raíz (g).

$\mu$  = Media poblacional.

$I_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima Inoculación. En este caso se utiliza la simbología  $I$  (Inoculación) para diferenciarlo del factor Tiempo, pero en el resto del trabajo se representa como  $T$  de Tratamiento. De esta manera se tienen dos tratamientos,  $T_0$ = sustrato sin inocular (testigo) y  $T_1$ = sustrato inoculado con Trichosoil®.

$T_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo Tiempo. Para este caso se tiene que  $t_1$ = 8 de febrero,  $t_2$ = 13 abril y  $t_3$ = 4 de junio.

$(IT)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre la  $i$ -ésima Inoculación y el  $j$ -ésimo Tiempo.

$\delta_i$  = Error asociado a la parcela mayor.

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

El modelo estadístico presenta una serie de supuestos a saber:

- El modelo es correcto (en relación al material experimental).
- Es aditivo.
- No existe interacción Tratamiento  $\times$  Tiempo.
- $\varepsilon_{ij} \sim N$ ;  $E(\varepsilon_{ij}) = 0$  para todo  $i, j$ ;  $V(\varepsilon_{ij}) = \sigma^2$  para todo  $i, j$ ; o sea que los errores experimentales ( $\varepsilon_{ij}$ ) son variables aleatorias independientes que presentan una idéntica distribución Normal, con media igual a cero y varianza constante para todos los  $i, j$ .
- Por definición  $\alpha_i = \mu_i - \mu$ .

Las hipótesis estadísticas de interés a probar son:

Hipótesis nula: Los plantines sin inocular presentan igual diámetro a la altura del cuello respecto a los plantines inoculados con *Trichoderma*; o sea, ver si realmente el valor medio del diámetro del cuello (medido en mm) para los plantines sin inocular, es significativamente igual (con  $p < 0,05$ ) al diámetro del cuello medio de los plantines inoculados.

$$H_0: \alpha T_0 = \alpha T_1$$

$$H_0: \mu T_0 = \mu T_1$$

Hipótesis alterna: Los plantines sin inocular presentan diferente diámetro a la altura del cuello respecto a los plantines inoculados con *Trichoderma*; o sea, ver si realmente el valor medio del diámetro del cuello (medido en mm) para los plantines sin inocular, es significativamente diferente (con  $p < 0.05$ ) al diámetro del cuello medio de los plantines inoculados.

$$H_a: \alpha T_0 \neq \alpha T_1$$

$$H_a: \mu T_0 \neq \mu T_1$$

Al igual que para la variable diámetro a la altura del cuello, las hipótesis nula y alterna se repiten para las demás variables en estudio (altura parte aérea, pesos frescos y secos).

El análisis de los resultados se realiza mediante ANAVA con el software Infostat<sup>®</sup>, donde se utiliza como criterio de decisión el rechazo de la hipótesis nula con  $p$  menor a 0,05 (nivel de significancia).

### 3.3 MUESTREO Y MEDICIONES

#### 3.3.1 Parámetros morfológicos en plantines

Los parámetros morfológicos medidos en los plantines corresponden al Diámetro a la Altura del Cuello (DAC), medido en mm y la Altura de la Parte Aérea (H), medida en cm. Para el primer caso se utilizó un calibre con precisión de 1mm y para el segundo, un centímetro con precisión de 1mm. En total se tomaron al azar 20 bandejas (10 inoculadas con Trichosoil<sup>®</sup> y 10 sin inocular), y se midieron el DAC y H en todos los plantines de las bandejas; cabe aclarar que todas las bandejas no poseían el 100% de plantines (72 plantines) por fallas en germinación, emergencia, etc. del lote de semilla. Ambos parámetros, se registraron en tres oportunidades durante el ciclo de producción de los plantines en el vivero, correspondiendo éstas a las fechas de: i) 8 de febrero, ii) 13 de abril y iii) 4 de junio, todas del año 2010. En la medición de los parámetros en diferentes fechas, siempre se utilizó las mismas bandejas aleatorizadas desde un principio, (repeticiones sobre las mismas bandejas a lo largo del tiempo).

Con los valores medios de los parámetros analizados, se calculan los diferentes índices propuestos en la sección 2.1.2, que determinan la calidad óptima de plantín para la especie *Pinus taeda*. Dichos índices se estudian para las mediciones realizadas en las tres fechas mencionadas anteriormente, o solo en las últimas dos, según si se cuenta con todos los factores de determinan cada uno de los índices. Los factores en estudio corresponden a: índice de

esbeltez, índice de calidad de Dickson, índice tallo raíz, índice de lignificación y porcentaje de raíces.

### **3.3.2 Parámetros fisiológicos en plantines**

Los parámetros fisiológicos medidos en los plantines corresponden al Peso Fresco Total (PF total), que a su vez se divide en Peso Fresco del Tallo (PFt) y Peso Fresco de las Raíces (PFr); también se incluye el Peso Seco Total (PS total), que a su vez se divide en Peso Seco del Tallo (PSt) y Peso Seco de las Raíces (PSr). Tanto en la medición de pesos frescos como secos, se utilizó una balanza de precisión electrónica con una precisión de 0,01 g. Para evaluar los pesos secos se sumerge el terrón o pan de sustrato en agua, con el fin de disgregarlo y separarlo del sistema radicular del plantín, tratando de dañar lo menos posible las raíces más pequeñas. Posteriormente se seca el agua en exceso del sistema radicular con papel secante, para luego secarlo definitivamente en estufa de secado de laboratorio a aproximadamente 70 °C, hasta que llegue a peso constante. Para la medición de PF total y PS total, de las bandejas inoculadas con Trichosoil<sup>®</sup>, se seleccionaron 50 plantines (5 por cada una de las 10 bandejas inoculadas sorteadas anteriormente para DAC y H). El mismo procedimiento se realizó para las bandejas sin inocular, aunque posteriormente se debieron retirar 5 plantines al azar de los 50 seleccionados para realizar otras pruebas; quedando así un total de 45 plantines muestreados sin inocular.

Otro parámetro fisiológico que se evaluó fue la concentración de nutrientes minerales mediante el análisis foliar. Dichos análisis se realizaron en un laboratorio local especializado en el rubro (Laboratorio del Sur SRL.) llevando a cabo los siguientes métodos de determinación: Para el nitrógeno se utilizó el método Kjeldahl de oxidación húmeda, propuesta por el mismo autor en el año 1883; para el fósforo se utilizó el método del ácido ascórbico propuesto por Murphy y Riley en el año 1962; para el potasio se utilizó la técnica de espectrofotometría de emisión atómica, previa digestión seca (cenizas); finalmente para calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre y boro, se utilizó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, previa digestión seca (cenizas). Para evaluar la concentración de nutrientes en tejidos, se seleccionaron en total 10 plantines al azar, donde 5 corresponden a las bandejas inoculadas con Trichosoil<sup>®</sup> y 5 a las sin inocular, obteniéndolos de las mismas 20 bandejas seleccionadas anteriormente para DAC y H (1 plantín por bandeja seleccionada).

A diferencia de los parámetros morfológicos, en los parámetros fisiológicos se toman las muestras en sólo dos periodos durante el ciclo de producción de los plantines en el vivero. Dichas fechas corresponden al 13 de abril y 4 de junio del 2010 (últimas dos fechas de para los parámetros morfológicos).

Otro parámetro que se analiza es el nivel de supervivencia de los plantines a lo largo del ciclo productivo en el vivero, según hayan sido o no inoculados con *Trichoderma*. Para este caso se contabilizaron el total de los plantines presentes en cada una de las bandejas seleccionadas para los parámetros DAC y H, para las tres fechas de muestreo que se venía trabajando.

### **3.3.3 Análisis isoenzimático**

El análisis de la actividad peroxidasa en los plantines se realizó mediante la técnica de análisis de isoenzimas. Dichos estudios fueron llevados a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, con el apoyo del Lic. Jorge Pereira.

De las 20 bandejas seleccionadas originalmente para DAC y H, en la fecha 4 junio del 2010 se tomó 1 plantín al azar para estudiar la actividad de peroxidación, totalizando 10 plantines inoculados con Trichosoil® y 10 sin inocular. De cada plantín a analizar se extrajo una cantidad de tejido foliar (asumiéndose que estaban en las mismas condiciones fisiológicas), según la repetición de la placa que corresponda (detallado en el cuadro 8). Con este material vegetal se preparó un extracto proteico, a partir del macerado de cada muestra de hoja, en tubos “eppendorf” de 1,5 ml con varillas de plástico y tijera entomológica, bajo temperatura controlada (aproximadamente 5°C) en 100 µl de un tampón de extracción de Proteínas (Souza-Chies, 1992), con la siguiente composición:

En un volumen final de 200 ml se preparó la siguiente solución:

Tris-HCl 50 mM pH 7,6	1,211 g
KCl 10 mM	149 mg
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 10 mM	406 mg
EDTA 1mM	74,44 mg
Beta mercapto-etanol	14 mM

A 10 ml de la solución preparada sin β-mercapto-etanol, se le agregaron 9,8 µl de dicho producto (11 – 14,3 moles).

**Cuadro No. 9:** Características de las muestras empleadas para la obtención de los homogeneizados de tejidos y corridas electroforéticas, según el No. de placa.

No. Repetición	Muestras sembradas por placa según tratamiento	Concentración de la relación Peso fresco tejido / agua (mg/ml)
Placa 1	3	50 / 100
Placa 2	6	5 / 50
Placa 3	6	50 / 50
Placa 4	6	50 / 50

Las migraciones electroforéticas de las muestras analizadas se realizaron en placas de acetato de celulosa (94 X 76 mm, Helena Laboratories, Beamont, TX; No. ref. 3024). La migración se desarrolló a temperatura ambiente en cubas horizontales de plástico (Helena, mod. 1283, 280 X 170 mm). El kits de aplicación (Helena) consiste de un aplicador, una placa de depósito de muestra, y una placa de alineamiento. Previo al “sembrado” (depósito de las muestras en la placa de acetato) mediante el kit de aplicación, la misma se somete a un paso de imbibición con el tampón de migración III Shaw y Prasad (1970) pH 8,0, con la siguiente composición:

1 l Preparación en un volumen final de 1l:

Tris 0,5 M	60,6 g/l
Ácido bórico	40,4 g/l
EDTA	6,0 g/l

Los parámetros referentes a la dilución del tampón de migración para la imbibición, el voltaje y el tiempo de migración, se pusieron a punto de manera empírica a los efectos de obtener los mejores resultados para el sistema isoenzimático en particular y el material vegetal a estudio. El tiempo de imbibición previo a la electroforesis fue de 20 minutos. El tiempo de migración varió según el ensayo entre 25 y 35 minutos, y el voltaje fue de 200 V. Durante la migración se controló la resistencia del sistema, de modo que la misma no excediera los 10 mA, para evitar el recalentamiento de la placa y la desnaturalización de la muestra (Richardson et al., 1986).

El posterior revelado de las placas de electroforesis se efectuó inmediatamente terminada cada migración, sobre una matriz de agarosa al 1,2 % (w/v), con los reactivos necesarios para la coloración específica. Las soluciones utilizadas para detectar la actividad de peroxidación presenta la siguiente composición (Richardson et al., 1986).



En una solución final de 10 ml se adicionaron los siguientes compuestos:

Acetato de sodio 0,2 M pH 5,0	9ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	200 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	5 µl
Amino etil carabazol	15 mg
Dimetilformamida (DMF)	1 ml

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

### **3.3.4 Sobrevivencia de *Trichoderma harzianum* cepa L1 en sustrato**

Para la evaluación de la sobrevivencia del antagonista durante el ciclo de producción de los plantines, se tomaron al azar 5 plantines de las 10 bandejas seleccionadas originalmente para DAC y H inoculadas con Trichosoil® y 5 plantines de las bandejas sin inocular. Cada uno de los 10 plantines seleccionados, se tomaron en dos fechas de muestreo, correspondientes al 13 de abril y 4 junio del 2010 (1 plantín por bandeja seleccionada).

El recuento de las colonias de *Trichoderma*, fue realizado por la Ing. Agr. Claudine Folch en los laboratorios pertenecientes a la empresa LAGE y Cía. S.A., y la técnica se resume a continuación.<sup>4</sup>

- I. Extracción de 10 g de sustrato de cada plantín y posteriores diluciones ( $\times 10^{-3}$ ,  $\times 10^{-4}$  y  $\times 10^{-5}$ ).
- II. 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:

Agar	10 g
Glicerol	9 cm <sup>3</sup> /l
Extracto de levadura	1,5 g/l
NaCl	0,1 g/l

<sup>4</sup> Folch, C. 2010. Com. personal.

MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/l
Sulfato de estreptomicina	50 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (al 50%)	1 g/l
Colorante rosa de bengala	0,15 g/l

- III. Se ajustó a un pH de 5 a 5,3. Las placas se prepararon 2 días antes de sembrar el inóculo, conteniendo 13 ml del medio cada placa.
- IV. Posteriormente a la siembra del inóculo, las placas se colocaron en estufa a  $23 \pm 2$  °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.
- V. El doble del recuento promedio de las placas (se multiplica por dos debido a que se usan 0,5 cm<sup>3</sup> por placa) se multiplica por la dilución que le corresponde. Los datos se expresan en UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de sustrato.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DIÁMETRO ALTURA CUELLO

El análisis de los resultados para esta variable (ver ANAVAs en la sección Anexos), indica que hay una interacción Tratamiento×Tiempo ( $P < 0,0001$ ), por lo que los resultados de los efectos principales (inoculación con *Trichoderma*) no pueden interpretarse directamente. En este caso al haber interacción entre la parcela mayor y la parcela menor, se elimina el factor tiempo del modelo para poder inferir sobre los efectos principales del experimento. Este procedimiento se realiza bajo el supuesto de que el factor Tiempo es significativo, motivo por el cual se elimina del modelo estadístico. Como dos mediciones sucesivas se toman entre un intervalo de tiempo suficiente (aproximadamente 8 semanas), no hay razón para pensar que el supuesto de que el factor Tiempo no vaya a ser significativo. Al eliminarse el factor Tiempo del modelo estadístico, el mismo pasa a ser DCA ( $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$ ) con tres experimentos aleatorios independientes entre ellos (uno para cada fecha de muestreo), siempre trabajando sobre las mismas unidades experimentales.

Una vez realizado el análisis para cada uno de los momentos de muestreo, se observa que la inoculación de los plantines con el hongo *Trichoderma* tuvo un efecto significativo, con  $p < 0,0001$  para los tres tiempos. De esta manera el DAC medio de los plantines inoculados (1,05 mm) es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al DAC de los sin inocular (0,99 mm) para el tiempo 1 (ver resultados en el cuadro 9). Para el tiempo 2, el DAC medio de los plantines inoculados es significativamente mayor al DAC de los plantines sin inocular (1,90 mm y 1,73 mm respectivamente). Finalmente para el tiempo 3, el DAC medio de los plantines inoculados es significativamente mayor a los sin inocular (2,72 mm y 2,16 mm respectivamente).

Curiosamente si se comparan los resultados obtenidos para la variable DAC en el tiempo 3, respecto a los índices propuestos por diferentes autores citados anteriormente, se observa que el DAC de los plantines dista algo de ser similar a los parámetros propuestos por ellos mismos. Para el caso de Carneiro el autor fija un DAC acorde mayor a los 3,7 mm; la empresa Weyerhaeuser propone uno de 4 mm y el Servicio Forestal de los Estados Unidos un DAC de 5 mm. Si bien se esta algo lejos en llegar a dichos niveles para el DAC, al menos la inclusión de *Trichoderma* al sustrato presenta una mejoría en el parámetro que lo hace aproximarse más a los propuestos por los autores en cuestión.

**Cuadro No. 10:** Resultados de las variables analizadas en plantines con y sin inocular con *Trichoderma harzianum*.

VARIABLE		SIN <i>Trichoderma</i>	CON <i>Trichoderma</i>
DAC (mm)	Tiempo 1	0,99 ± 0,23 a	1,05 ± 0,28 b
	Tiempo 2	1,73 ± 0,43 a	1,90 ± 0,66 b
	Tiempo 3	2,16 ± 0,43 a	2,72 ± 0,64 b
H (cm)	Tiempo 1	2,65 ± 0,41 a	2,78 ± 0,39 b
	Tiempo 2	14,64 ± 2,82 a	14,82 ± 2,56 a
	Tiempo 3	20,87 ± 3,93 a	24,97 ± 4,71 b
PF total (g)		0,66 ± 0,30 a	0,78 ± 0,41 b
PFt (g)	Tiempo 2	1,41 ± 0,50 a	1,56 ± 0,47 a
	Tiempo 3	2,66 ± 0,99 a	3,63 ± 1,51 b
PFr (g)		1,16 ± 0,73 a	1,24 ± 0,73 a
PS total (g)		0,83 ± 0,39 a	0,97 ± 0,51 b
PSt (g)		0,49 ± 0,22 a	0,59 ± 0,30 b
PSr (g)		0,17 ± 0,09 a	0,19 ± 0,11 a

Letras diferentes para la misma variable indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 ALTURA PARTE AÉREA

El análisis de los resultados muestra que hay una interacción Tratamiento×Tiempo ( $P < 0,0001$ ), por lo que los resultados de los efectos principales no pueden interpretarse directamente. De esta manera se procede de igual forma que para la variable DAC, transformando el modelo de parcelas divididas a uno de DCA, teniendo en cuenta los supuestos considerados anteriormente.

Los análisis estadísticos para la variable H muestran que para los tiempos 1 y 3 de muestreo, la incorporación de *Trichoderma* al sustrato tuvo un efecto significativo ( $p < 0,0001$ ) para ambos casos, pero para el tiempo 2 de muestreo no presentó un efecto significativo ( $p = 0,2287$ ). De esta manera, la H media de los plantines inoculados (2,78 cm y 24,97 cm) es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la de los plantines sin inocular (2,65 cm y 20,87 cm) para el tiempo 1 y 3 respectivamente. Para el tiempo 2, la H media de los plantines inoculados (14,82 cm) no es significativamente diferente a la de los plantines sin inocular (14,64 cm).

Al contrario de lo que sucede para el parámetro DAC, la H de los plantines inoculados sí se corresponde a los índices propuestos para la especie *Pinus taeda*. En este caso para el tiempo 3 se obtiene una H de 24,97 cm y los

diferentes autores proponen valores de entre 20 y 30 cm; 20 y 25 cm y 25,4 cm, para Carneiro, la empresa Weyerhaeuser y el Servicio Forestal de los Estados Unidos respectivamente.

### **4.3 PESO FRESCO**

Los resultados obtenidos para la variable PF total sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,0876$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p=0,0047$ ) sobre el PF total, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, se puede inferir que el PF total medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (0,78 g), es significativamente superior al PF total medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (0,66 g).

#### **4.3.1 Peso fresco tallo**

Los resultados obtenidos sugieren que hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,0068$ ), por lo que los resultados de los efectos principales no pueden interpretarse directamente. Al igual que en casos anteriores, donde ocurría una interacción entre las parcelas mayor y menor, se transforma el modelo estadístico a uno DCA.

Los nuevos resultados indican que para el Tiempo 1, el tratamiento de incorporación de *Trichoderma harzianum* no produce diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,1227$ ) y para el tiempo 2, si las hay ( $p=0,0002$ ). De esta manera, no hay diferencias significativas entre los PFT medios de los dos Tratamientos para el Tiempo 1 (1,41 g y 1,56 g) y si hay diferencias significativas para los PFT medios para el tiempo 2 (2,66 g y 3,63 g).

#### **4.3.2 Peso fresco raíz**

Los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,7441$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: no existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p=0,3448$ ) sobre el PFr, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, puede inferirse que el PFr medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (1,24 g), no es significativamente diferente al PFr medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (1,16 g).

#### 4.4 PESO SECO

Los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,1046$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p=0,0115$ ) sobre el PS total, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, puede inferirse que el PS total medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (0,97 g), es significativamente superior al PS total medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (0,83 g).

##### 4.4.1 Peso seco tallo

Los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,0752$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p=0,0015$ ) sobre el PSt, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, puede inferirse que el PSt medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (0,59 g), es significativamente superior al PSt medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (0,49 g).

##### 4.4.2 Peso seco raíz

Los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,2117$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: no existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p=0,2583$ ) sobre el PSr, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, puede inferirse que el PSr medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (0,19 g), no es significativamente diferente al PSr medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (0,17 g).

#### 4.5 ÍNDICES DE CALIDAD DE PLANTÍN DE *Pinus taeda*

En el cuadro 9 se resumen los resultados obtenidos para los índices propuestos en la revisión bibliográfica, que determinan la calidad óptima de un plantín de *Pinus taeda* para plantación.

Para el Índice de Esbeltez los resultados sugieren que hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p<0,0001$ ), por lo que los resultados de los efectos principales no pueden interpretarse directamente. Al igual que en casos anteriores, donde ocurría una interacción entre la parcela mayor y menor, se

transforma el modelo estadístico a uno DCA. Los nuevos resultados con el modelo DCA indican que, para el Tiempo 1 la inoculación con *Trichoderma* no produce diferencias significativas ( $p= 0,4797$ ) y para los Tiempos 2 y 3, si las hay ( $p < 0,0001$  y  $p= 0,0147$  respectivamente). De esta manera, no hay diferencias significativas entre el Índice de Esbeltez medio de los plantines sin inocular (2,83) y el Índice de Esbeltez medio de los plantines inoculados (2,86) para el Tiempo 1. A su vez, el Índice de Esbeltez medio de los plantines inoculados (8,11 y 9,57) es significativamente menor al Índice de Esbeltez medio de los plantines sin inocular (8,86 y 9,93) para el tiempo 2 y 3 respectivamente. Anteriormente se había mencionado que bajos niveles de este índice, están asociados a mejor calidad de plantín; de esta manera los plantines creciendo en sustrato inoculado con *Trichoderma* presentan una mejor calidad en los Tiempos 2 y 3 de medición.

Comparando los parámetros obtenidos en este índice con los propuestos por Carneiro (1995), se concluye que los plantines presentan un elevado índice en el Tiempo 3, ya que el máximo propuesto por el autor es del orden de 8,1. Comparando los mismos resultados con los propuestos por la empresa Weyerhaeuser, citados por Birchler et al. (1998), también se llega a la misma conclusión de que los plantines presentan un elevado Índice de Esbeltez, ya que se propone un índice máximo de 6,25.

**Cuadro No. 11:** Principales índices que determinan el patrón de calidad de plantines de *Pinus taeda* para plantación.

ÍNDICES	Tiempo de medición	TRATAMIENTOS	
		SIN <i>Trichoderma</i>	CON <i>Trichoderma</i>
Esbeltez	8 febrero	2,83 ± 0,75 a	2,86 ± 1,00 a
	13 abril	8,86 ± 2,49 a	8,11 ± 1,74 b
	4 junio	9,93 ± 2,50 a	9,57 ± 2,43 b
Tallo-raíz		3,07 ± 0,96 a	3,36 ± 1,00 b
ICD (*)	13 abril	0,048	0,059
	4 junio	0,081	0,10
Lignificación	13 abril	21,34 ± 5,12 a	21,37 ± 4,80 a
Porcentaje de raíces		0,015 ± 0,025 a	0,016 ± 0,029 b

(\*) Índice de calidad sin análisis estadístico.

Letras diferentes para la misma variable indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Este efecto de elevado Índice de Esbeltez puede estar asociado a una producción con alta densidad de plantines que limiten la ramificación de los mismos e induzca a la producción de plantines ahilados (con mucha altura); o a que el volumen del contenedor limite el desarrollo del sistema radicular.

Para el Índice Tallo-Raíz los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p= 0,6076$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p= 0,0222$ ) sobre el mencionado índice. Por lo tanto, puede inferirse que el Índice Tallo-Raíz medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (3,36), es significativamente superior al Índice Tallo-Raíz medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (3,07).

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los propuestos por Carneiro (1995), se visualiza claramente que los plantines presentan un índice mayor al propuesto por el autor, ya que se cita como intervalo óptimo entre 2,12 y 2,87. Según este intervalo, la inclusión de *Trichoderma* al sustrato tiene un efecto negativo ya que, los plantines sin inocular presentan un índice que se aproxima más a los propuestos por el autor. Sin embargo si se hace una comparación con los parámetros propuestos por Wakeley, citado por Carneiro (1995), los plantines inoculados con *Trichoderma* están en el límite superior del intervalo propuesto por el autor, que va desde 1 a 3. Este alto índice encontrado para los plantines, se podría justificar debido a que como ya se mencionó, la inclusión de *Trichoderma* en el sustrato tiene un efecto positivo sólo en los pesos secos de la parte aérea, pero no se encontraron diferencias significativas para los pesos del sistema radicular.

El Índice de Calidad de Dickson (ICD) es el único índice que no se analiza estadísticamente debido a que su fórmula combina parámetros morfológicos (medidos en el vivero, Rivera) como fisiológicos (medidos en el laboratorio de Protección Forestal, Montevideo) por lo que no resultó posible medir el ICD individual de cada plantín. De esta manera se trabaja solo con los valores medios de cada una de las variables que forman parte del mencionado índice de calidad.

Observando los valores medios para el ICD, se concluye que los plantines creciendo en presencia de *Trichoderma*, presentarían mejores parámetros de calidad de plantín para plantación en el último tiempo de muestreo, debido a que un ICD bajo se asocia a mejor calidad del mismo.

Para el Índice de Lignificación los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento×Tiempo ( $p=0,8767$ ), por lo que los resultados de los



efectos principales pueden interpretarse directamente: no existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p= 0,9515$ ) sobre el Índice de Lignificación, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, puede inferirse que el Índice de Lignificación medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (21,37), no es significativamente diferente al Índice de Lignificación medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (21,34). El igual comportamiento sobre el Índice de Lignificación de los plantines bajo diferentes tratamientos, puede ser justificado debido a que los plantines no entraron en una etapa de rustificación dentro del vivero, por lo que el antagonista no presenta un efecto sobre el índice en cuestión.

Si se compara los resultados obtenidos en este trabajo, con respecto a los obtenidos por Prieto et al. (2004) se observa que se obtienen similares índices, dado que los autores encuentran un Índice de Lignificación de 21,21 para *Pinus engelmannii* en pantines creciendo sin estrés hídrico.

El último parámetro presentado en el cuadro 9 corresponde al Porcentaje de Raíces. Como se observa, los resultados sugieren que no hay interacción Tratamiento $\times$ Tiempo ( $p= 0,3692$ ), por lo que los resultados de los efectos principales pueden interpretarse directamente: no existe efecto de la incorporación del antagonista ( $p= 0,8106$ ) sobre el Porcentaje de Raíces, para un nivel de significancia de  $p<0,05$ . Por lo tanto, puede inferirse que el Porcentaje de Raíces medio de los plantines creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum* (0,016), no es significativamente diferente al Porcentaje de Raíces medio de los plantines creciendo en ausencia del antagonista (0,015).

Este comportamiento se fundamenta en principio, a que *Trichoderma* tuvo un efecto positivo en el aumento de biomasa producida, solo en la parte aérea de los plantines (tanto de peso fresco como de peso seco), pero no hubo diferencias significativas para los tratamientos en el sistema radicular. De esta manera, los plantines inoculados van a presentar un menor porcentaje de raíces como los observados en este trabajo.

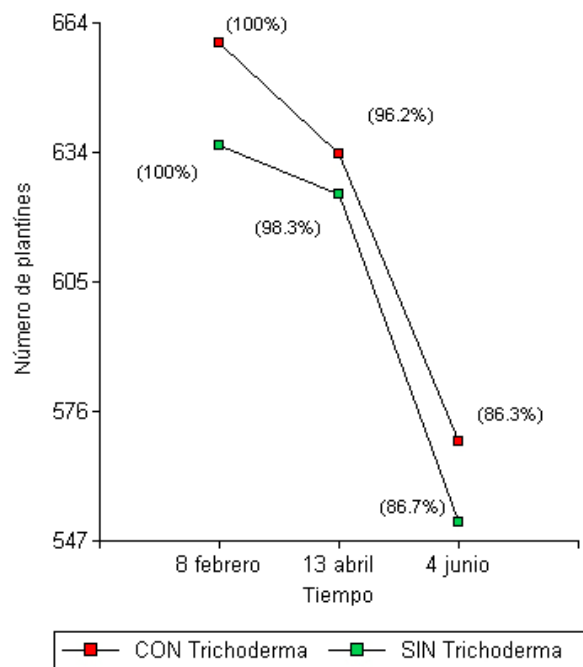
#### **4.6 SOBREVIVENCIA DE PLANTINES**

En la cuadro 12 se observa el número de plantines que sobrevive en las bandejas en cada fecha de muestreo, a lo largo del ciclo productivo de los plantines en el vivero. Si bien se observa que cada uno de los tratamientos (con o sin *Trichoderma*) presenta similares niveles de sobrevivencia que rondan el 86% respecto al primer tiempo de medición, el número final de plantines que

sobrevive en presencia del antagonista es considerablemente mayor respecto a los plantines que crecen en ausencia del antagonista. Para este caso, llegan a turno final un 3,3% más de plantines con sustrato colonizado por *Trichoderma*, con respecto a los plantines sin inocular.

Para el cálculo de los niveles de sobrevivencia en el tercer tiempo de muestreo (4 de junio), hay que tener presente que 15 plantines fueron colectados en la fecha número dos (13 de abril) para pruebas de concentración de nutrientes (5 plantines por tratamiento) y análisis isoenzimático (10 plantines por tratamiento), por lo que no son considerados en el cálculo de sobrevivencia (se suman a los plantines que sobreviven).

**Cuadro No. 12:** Sobrevivencia de plantines a lo largo del ciclo productivo en vivero, según tratamiento. Entre paréntesis porcentaje de sobrevivencia con respecto al tiempo 1 de muestreo (100%).



En el gráfico se observa que ambos tratamientos presentan similar comportamiento a los largo del tiempo, pero en el caso de los plantines inoculados a mayores niveles de sobrevivencia. Los dos tratamientos exhiben una menor tasa de mortalidad durante el primer período de muestreo (el tratamiento con inoculación algo más elevada), pero para el segundo período la misma tasa aumenta considerablemente en ambos casos.

#### 4.7 ESTADO NUTRICIONAL

En el cuadro 13 se observan las concentraciones de nutrientes minerales en acículas de los plantines de *Pinus taeda* bajo estudio. Los análisis foliares correspondientes se discriminan según la fecha en que fueron tomadas las muestras para el análisis, así como si recibieron o no el tratamiento de incorporación de *Trichoderma* al sustrato.

**Cuadro No. 13:** Concentración foliar de los diferentes minerales correspondientes a las dos fechas de muestreo.

Fecha muestreo	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu	B
	% de materia seca					ppm				
13 abril SIN <i>Trichoderma</i>	1,85	0,36	0,90	0,23	0,15	60	205	23	25	49
13 abril CON <i>Trichoderma</i>	1,73	0,29	1,03	0,31	0,14	50	190	23	48	44
4 junio SIN <i>Trichoderma</i>	1,79	0,30	1,00	0,18	0,11	55	170	17	21	51
4 junio CON <i>Trichoderma</i>	1,94	0,33	1,10	0,22	0,13	44	190	16	26	48

En el cuadro anterior se puede visualizar que salvo en algunos casos, la concentración de nutrientes minerales entra dentro de los parámetros propuestos por May (1984) en niveles óptimos, como por Landis (1989) en intervalos de suficiencia. Esto traería como consecuencia un adecuado programa de fertilización manejado por la empresa para la especie *Pinus taeda*.

Para los nutrientes minerales más importantes (y por lo tanto de mayor demanda) como lo son el N, P y K, se observa que sus concentraciones presentan una tendencia de mayor concentración para los casos en que los plantines se han desarrollado en sustratos colonizados por *Trichoderma*. Este aumento de la concentración nunca sobrepasa los niveles superiores de suficiencia, por lo que no se llega a un consumo de exceso por parte de los plantines, que en caso de serlo, incidiría en los costos de producción de los mismos por conceptos de fertilizantes.

En lo que respecta a las concentraciones donde no se llega a los niveles de suficiencia propuestos por Landis (1989), se tiene a los nutrientes minerales de Ca y Fe. Para el Ca en el primer análisis se observa que los plantines sin inocular presentan una concentración mineral muy próxima al nivel inferior del rango de suficiencia propuesto por Landis (1989); sin embargo, dicha situación se mejora, gracias a la inoculación con *Trichoderma*. Para la segunda fecha de muestreo, la situación mantiene la misma tendencia, pero se observa que se pasa de un nivel de insuficiencia a uno de suficiencia (de 0,18% a una mayor que 0,20%).

Mención especial presentan los micronutrientes Fe y Cu. Para el caso del primer nutriente mineral, se observa que en ninguna de las cuatro mediciones se llega a los niveles de suficiencia propuestos por Landis (1989), por lo que se debería corregir dichos niveles proporcionados durante el fertirriego.

Muchos de los viveros forestales del país (sobre todo los instalados en el litoral norte), que se encuentran sobre suelos de origen sedimentario, presentan limitaciones en la disponibilidad de hierro con el agua de riego, debido al uso de fuentes con importante alcalinidad cálcica como en muchos pozos del litoral norte. Sin embargo, en esta situación se descarta dicho inconveniente, ya que el vivero se encuentra sobre suelos con origen en las areniscas de Tacuarembó, y las fuentes de agua de riego provienen del acuífero Guaraní con excelentes calidad de aguas para riego (conductividad eléctrica 0,1mS/cm y pH 5,0).

Como se ha mencionado anteriormente, hay una compleja interacción en el sistema sustrato-plantín-antagonista entre la cantidad y disponibilidad del mineral hierro. En casos de insuficiencia de aportes de hierro mediante fertirriego (como pareciera serlo este), el antagonista *Trichoderma* incorporado al sustrato entra en competencia por el nutriente mineral y hay una inmovilización parcial del hierro. Esto es evidenciado en los dos momentos de muestreo de concentración foliar, donde para ambos casos, la concentración del mismo en plantines es menor cuando han sido inoculados con el antagonista. Como *Trichoderma* es un excelente competidor por el hierro en circunstancias de escasez, la concentración mineral del mismo en los plantines disminuye en presencia del antagonista. Cabe aclarar que si bien la concentración de hierro disminuye en presencia del antagonista, se maneja una concentración que entra dentro del intervalo de necesidad oculta (cuadro 5) ya que no se visualizan síntomas de deficiencia del micronutriente.

La supuesta inmovilización parcial de hierro observada en este trabajo, también ha sido reportada en trabajos anteriores por Cárdenas (2003), para la misma cepa del antagonista y sobre la misma especie forestal.

Bajo estas circunstancias, se debería aumentar la oferta de hierro ajustando el programa de fertilización, de manera de cubrir la demanda tanto de la biomasa microbiana de *Trichoderma* como de los plantines, y no generar una relación de competencia entre ambos.

La otra consideración importante sobre la concentración mineral en los plantines la merece el Cu. El cobre es en único mineral que en todas las mediciones efectuadas sobrepasa el rango de suficiencia propuesto por Landis (1989) que lo fija entre 4-20 ppm. Anteriormente ya se ha mencionado la capacidad de algunas cepas de *Trichoderma harzianum* de solubilizar el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ , transformándolo en una forma disponible para las plantas. Este proceso podría suceder en este caso, donde los plantines inoculados con el antagonista presentan una concentración mayor del mineral, y que alcanzan concentraciones que caen dentro del intervalo de consumo en exceso. Como alternativa de manejo, se debería disminuir los aportes de Cu mediante la fertilización, para que los plantines salgan de una condición de consumo de exceso y entren en una de consumo óptimo.

Tanto para la solubilización del Mg propuesta por Harman et al., citados por Benítez et al. (2004), como para la del Mn propuesta por Altomare et al. (1999), se observa un comportamiento desigual frente a la inclusión de *Trichoderma* al sustrato. En los dos casos se visualiza una disminución en la concentración foliar de dichos minerales para la primera fecha de muestreo, pero dicha situación se revierte en la segunda fecha de evaluación. Este aumento en la concentración foliar, podría justificarse por la acción solubilizadora de los minerales por parte de *Trichoderma harzianum*, propuesta por los dos autores anteriores.

Finalmente para el nutriente mineral B, se observa la misma tendencia de inmovilización parcial que en el hierro, dado que en ambas fechas de muestro, los plantines creciendo bajo la presencia de *Trichoderma* presentan menores concentraciones foliares. Para el boro este mismo comportamiento ha sido registrado en trabajos anteriores de Añon et al. (2004), trabajando con la misma cepa de antagonista e igual especie forestal.

#### 4.8 ANÁLISIS ISOENZIMÁTICO

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en las migraciones electroforéticas efectuadas.

En la placa 1 ensayada con las condiciones de migración de Tampón III Shaw-Prasad diluído al 30% y tiempo de 30 minutos, se observan seis muestras de plantines, los tres primeros inoculados con *Trichoderma* y los tres restantes sin inoculación. Todas las muestras analizadas presentan dos zonas de actividad enzimática de migración diferencial en el campo eléctrico. Sin embargo, la muestra 3 que fue inoculada con *Trichoderma* presenta una zona de actividad suplementaria intermedia entre las dos anteriores (indicada con una flecha en la foto), aunque las muestras 1 y 2 que también fueron inoculadas, no la presentan.

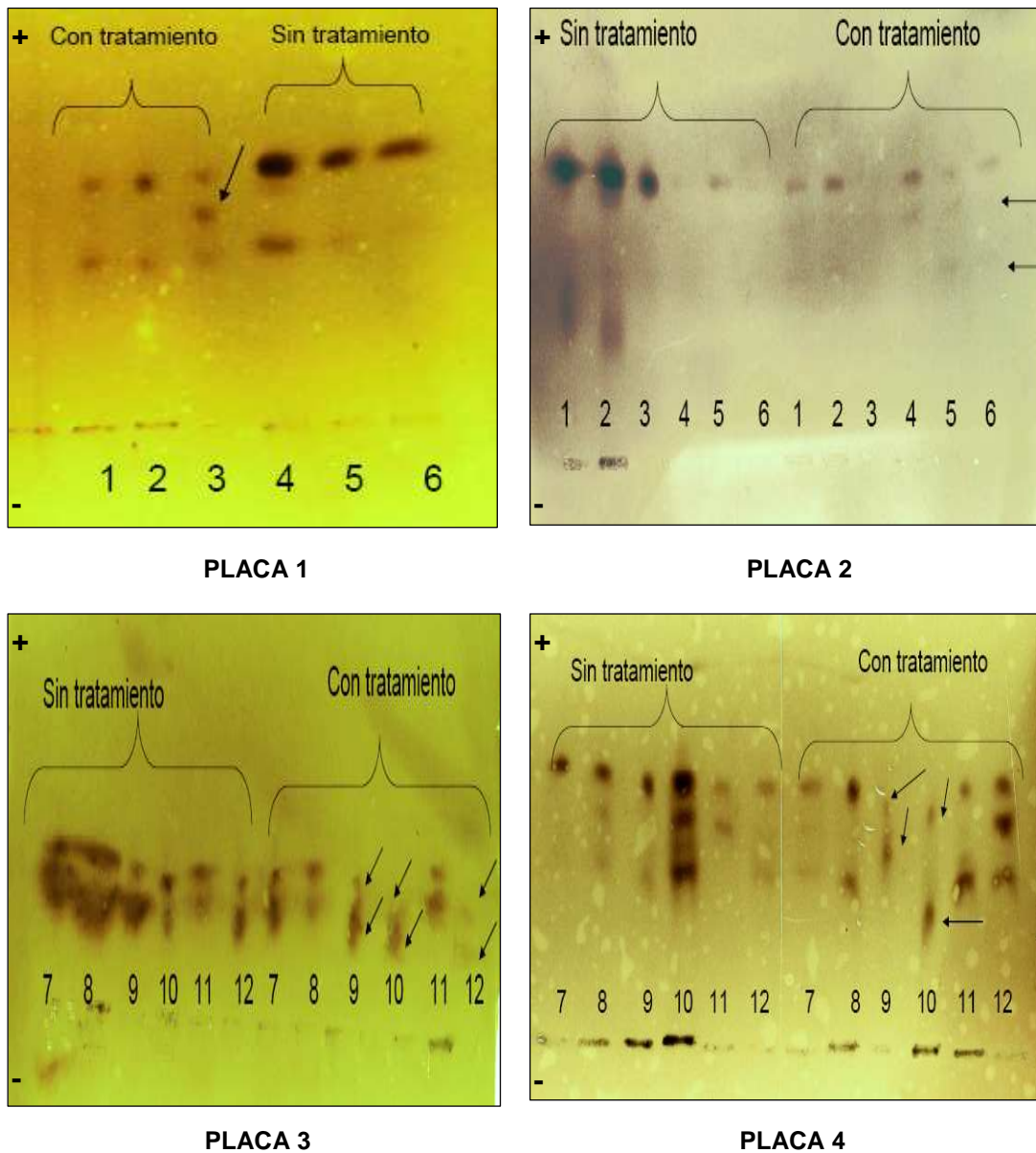
En la placa 2 con diferentes condiciones de migración que la placa 1 (Tampón III Shaw-Prasad diluído al 25% y tiempo de 35 minutos), pero con las mismas muestras, se observa que todas presentan en común la zona de actividad de mayor migración en el campo eléctrico (más electronegativa) y que coincide con la misma zona observada en la placa 1. También se visualiza con claridad que todos los individuos inoculados con *Trichoderma*, presentan dos bandas más electropositivas, suplementarias, (de menor migración en el campo eléctrico) que no aparecen en las muestras de plantines sin inocular (se indican con flechas en la foto).

La placa 3 (con iguales condiciones de migración que la placa 1), se realiza con diferentes plantines a los utilizados en las dos primeras migraciones electroforéticas y nuevamente se visualiza que las muestras inoculadas con *Trichoderma* presentan la misma disposición de zonas de actividad peroxidasa que en la placa 2. Se observan las mismas dos zonas de actividad enzimática (se indican con flechas en la foto), pero de menor migración (más electropositivas). Asimismo, en estas condiciones experimentales, se observa que todas las muestras de plantines sin inocular presentan una nueva zona de actividad peroxidasa de menor migración, que no se había detectado con las condiciones electroforéticas de los anteriores ensayos (placa 1 y 2).

En la placa 4 con las mismas muestras que la placa 3 y con condiciones de migración iguales a los de la placa 2, se visualizan las mismas zonas de actividad de menor migración para las muestras inoculadas con *Trichoderma*, pero en diferentes posiciones (se indican con flechas) debido a que se cambian las condiciones de migración. Como en los casos anteriores, las muestras de

plantines sin inocular presentan igual esquema de zonas de actividad peroxidasa que sus similares de la placa 3.

**Figura No. 6:** Visualización de la actividad peroxidasa en los diversos ensayos electroforéticos efectuados.



A partir de los resultados observados en las cuatro placas electroforéticas con diferentes condiciones de migración, se puede proponer que el análisis de expresión de genes con actividad de peroxidación mediante la técnica de electroforesis, en homogeneizados de hojas de *Pinus taeda* creciendo en sustrato inoculado con *Trichoderma* y sin inocular, muestran diferencias en función del tratamiento de inoculación. La mayoría de las muestras inoculadas con *Trichoderma* mostraron en los cuatro ensayos, en general una o dos zonas de actividad enzimática suplementaria más electropositiva (según las muestras analizadas). La respuesta de los plantines al tratamiento de inoculación no es regular entre las diferentes muestras estudiadas y los perfiles isoenzimáticos de actividad peroxidásica no resultaron constantes frente al agregado de *Trichoderma*. Dicha respuesta desigual, se fundamenta a partir de la observación de que algunas muestras presentan patrones de bandas de un tipo, como los visualizados en las placas 1 y 2, y otros individuos con un patrón observado en las placas 3 y 4.

Igualmente resulta claro que en los experimentos realizados, la técnica de electroforesis con tinción específica para la actividad peroxidásica permitió detectar diferencias entre las muestras de los diversos plantines que crecen en diferentes sustratos (inoculados o no con *Trichoderma*), teniendo presente las diferentes condiciones del ensayo de electroforesis. Una hipótesis que explicaría los resultados obtenidos es que los tratamientos con *Trichoderma* alteraron la expresión de la isoenzima peroxidasa, ya que la electroforesis detecta diferencias entre diferentes muestras vegetales que expresan su información genética de manera diferente. Bajo las condiciones experimentales del ensayo, ha sido posible detectar cambios en la expresión post transcripcional (luego que el ADN es traducido a ARN y este es transcrito a proteína). Esto se podría haber debido a la capacidad de *Trichoderma* en inducir ISR, no alterándose la expresión de la información genética de la planta, sino que activándose un conjunto de genes PR (NPR1, MYB72 y ELI3; según el modelo de ISR propuesto por Van Wees et al., 2008) relacionados con la defensa de los materiales vegetales de las muestras y que en este caso corresponden a genes con actividad de peroxidación.

En referencia a las diferentes condiciones de migración ensayadas, se observa que para las muestras utilizadas en las dos primeras placas (plantines del 1 al 6), correspondería las de Tampón III Shaw-Prasad diluido al 25% y tiempo de 35 minutos (placa 2), como las mejores para detectar la influencia del tratamiento en los plantines. Esto se debe a que en la placa 2 todas las muestras con igual tratamiento presentan similar actividad peroxidasa, comportamiento que no se observa en las muestras inoculadas de la placa 1. Asimismo en los plantines utilizados en las placas 3 y 4 (plantines del 7 al 12), las dos condiciones de migración utilizadas, permiten diferenciar claramente la



actividad de peroxidasa entre plantines con diferente tratamiento; por lo que en estos dos casos, cualquiera de las dos condiciones ensayadas serviría para encontrar diferencias entre tratamientos.

#### 4.9 SOBREVIVENCIA DE *Trichoderma* EN SUSTRATO

En el cuadro 14 se presentan los resultados obtenidos sobre el estudio de la sobrevivencia de *Trichoderma harzianum* cepa L1 en el sustrato, a lo largo del ciclo productivo de los plantines en el vivero. Como Trichosoil® es un producto comercial que presenta como sustancia activa a un microorganismo vivo, es deseable que la formulación de dicho producto presente una estabilidad a lo largo del tiempo, para asegurar su funcionalidad. Con estas condiciones es importante asegurar la mayor sobrevivencia posible de las colonias de *Trichoderma harzianum* que forman parte del producto comercial, una vez incorporado al sustrato.

**Cuadro No. 14:** Concentración de *Trichoderma harzianum* en sustrato, según fecha de muestreo y tratamiento (expresadas en UFC/g sustrato).

Tiempo de muestreo	Tratamiento al sustrato	
	SIN <i>Trichoderma</i>	CON <i>Trichoderma</i>
13 abril	4,8 x 10 <sup>4</sup> ufc/g	3,2 x 10 <sup>5</sup> ufc/g
4 junio	1,7 x 10 <sup>4</sup> ufc/g	1,6 x 10 <sup>4</sup> ufc/g

En el cuadro anterior se puede visualizar que para la primera fecha de muestreo, el sustrato al que se le incorporó Trichosoil® presenta una concentración diez veces mayor de *Trichoderma harzianum* (expresada como unidades formadoras de colonias sobre gramo de sustrato) con respecto al sustrato que no fue inoculado. Se evidencia también que la turba que conforma el sustrato presenta en su materia orgánica, cepas naturales de *Trichoderma harzianum* al ser un hongo cosmopolita, que se encuentra en la mayoría de la microflora edáfica.

Los resultados obtenidos para el primer momento de muestreo indican una buena instalación del hongo en el sustrato, considerando que han pasado tres meses desde su incorporación al mismo. También se concluye que la técnica empleada en el vivero para la incubación del producto una vez incorporado al sustrato, permite una buena esporulación del hongo, reflejada en el aumento de la concentración del mismo.

Los resultados muestran que para el segundo momento de muestreo, la concentración de colonias de *Trichoderma harzianum* en el sustrato inoculado

disminuyen a los mismos niveles que para el sustrato sin inocular. De esta manera, los niveles de sobrevivencia del antagonista bajo las condiciones de producción del vivero, llegan a comprometerse una vez pasado los 5 meses desde su inoculación.

## 5 CONCLUSIONES

A través de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pudo comprobar que el producto comercial Trichosoil® tuvo un efecto promotor del crecimiento sobre plantines de *Pinus taeda*, producidos en un vivero forestal. Este efecto se constata a nivel de las variables diámetro a la altura del cuello y altura de la parte aérea. También se observa un incremento de la biomasa producida, reflejada en el aumento de los pesos frescos y secos de los plantines. El incremento mencionado anteriormente, se basa en las diferencias observadas en la parte aérea de los plantines, pero no se encontraron diferencias para el sistema radicular.

En lo que respecta a la calidad óptima de los plantines de *Pinus taeda* producidos en el vivero, Trichosoil® presentó un desempeño variable. En la variable diámetro del cuello, no se llega a los diámetros preestablecidos por diferentes autores (USDA s.f., Carneiro 1995, Birchler et al. 1998) pero la inclusión del producto mejora dicho parámetro en comparación a los definidos por dichos autores. En la variable altura de la parte aérea, si se llega a los niveles preestablecidos por dichos autores. Para los índices Tallo-Raíz y Porcentaje de Raíces, el tratamiento con Trichosoil® presentó un efecto negativo sobre la calidad óptima de los plantines. Los resultados obtenidos para ambos índices de calidad, se justifican debido a que *Trichoderma* tuvo un efecto de promoción del crecimiento solo en la parte aérea de los plantines y no en el sistema radicular. También se concluye que para los índices de calidad de Esbeltez, Dickson y Supervivencia de plantines, el producto presentó un efecto positivo, evidenciándose dicho efecto por un aumento de los tres índices en cuestión. El único índice de calidad que no presentó variación con respecto a la inoculación con *Trichoderma* fue en Índice de Lignificación. En este caso, el comportamiento semejante de los plantines se justifica debido a que los mismos no pasaron por una etapa de rustificación en el vivero. Si bien no hubo un efecto de los Tratamientos, se llega a valores similares propuestos por Prieto et al. (2004) para el Índice de Lignificación en *Pinus engelmannii*. Finalmente para la concentración de nutrientes minerales, el efecto del tratamiento con Trichosoil® mostró un efecto positivo al aumentar la concentración foliar de los mismos; aunque se constató un efecto negativo en los minerales hierro y boro, debido probablemente a un efecto de competencia (para el primero llegando a niveles de insuficiencia) y en el cobre, debido a una excesiva fertilización por parte del vivero.

Otro efecto que se pudo constatar por la aplicación de Trichosoil®, fue la inducción de resistencia a enfermedades en los plantines. La inclusión en el

sustrato de *Trichoderma harzianum* induce cambios en la expresión de un conjunto de genes relacionados a la defensa de la planta (genes PR) que probablemente aumentan los niveles de defensa de la misma. Los cambios observados se constataron a nivel de la expresión de los genes que codifican enzimas con actividad de peroxidación. Si bien se observaron diferencias en los resultados de los plantines por la incorporación de Trichosoil<sup>®</sup>, la falta de homogeneidad en la respuesta de los plantines se puede haber debido a la variación en las condiciones experimentales de electroforesis y a la posible variabilidad genética entre los individuos analizados.

Por último, se observó que la colonización y supervivencia de *Trichoderma harzianum* en el sustrato, llegó a niveles apropiados pasados los dos meses de su incorporación al sustrato. Sin embargo pasados los cinco meses, la concertación de *Trichoderma harzianum* en el sustrato disminuye considerablemente, siendo despreciable al momento de la plantación.

## 6 RESUMEN

Diversos estudios sobre control biológico de enfermedades, han posicionado al género de hongos *Trichoderma* como uno de los más promisorios agentes de control biológico de enfermedades. Una de las características más significativas que presenta dicho género, se basa en los diversos mecanismos de acción, que conllevan a disminuir el riesgo de aparición de razas resistentes de patógenos. En este sentido, existen antecedentes a nivel local (sobre todo en el rubro hortícola) que incorporan la técnica de control biológico de enfermedades como una herramienta más, dentro del sistema de producción. Es así que a mediados de la década del 90, aparecen los primeros trabajos específicamente dentro del rubro forestal, enmarcados en la fase de vivero. Debido al gran desarrollo que ha venido teniendo el sector forestal en los últimos años, cada vez es mayor la demanda de plantines de calidad, por parte de las diferentes empresas del rubro para la plantación. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente, en este trabajo se estudia la conveniencia de incorporar el producto comercial Trichosoil<sup>®</sup>, al sustrato de producción de un vivero forestal. De los diferentes mecanismos de acción que presenta el género *Trichoderma*, en este trabajo se evalúan el efecto promotor en el crecimiento en plantas, la inducción de resistencia a enfermedades y la solubilización de nutrientes minerales. El efecto promotor del crecimiento en los plantines se evalúa a través de su calidad, definida por diferentes parámetros: altura parte aérea, diámetro del cuello, peso fresco y peso seco, concentración de nutrientes minerales y supervivencia de plantines. Asimismo se utilizan diversos índices que determinan la calidad óptima de plantines de *Pinus taeda* para plantación, entre los que se encuentran: índice de esbeltez, índice tallo-raíz, índice de calidad de Dickson, índice de lignificación y porcentaje de raíces. El efecto de inducción de resistencia en los plantines se estudia a través del análisis isoenzimático, mediante la técnica electroforética de proteínas con actividad peroxidasa. Finalmente, la solubilización de nutrientes minerales se estudia en base a diferentes análisis foliares realizados a lo largo del ciclo de producción de los plantines. Por último, se estudia la supervivencia de *Trichoderma harzianum* cepa L1 (sustancia activa de Trichosoil<sup>®</sup>), mediante el recuento de colonias de la cepa desde que se inoculó al sustrato de producción, hasta que los plantines son despachados a campo. Los resultados obtenidos indican que la inclusión de *Trichoderma harzianum* en el sustrato tuvo un efecto positivo en las variables diámetro del cuello y altura, aumentando dichos parámetros. A su vez, se pudo comprobar el efecto positivo de *Trichoderma* en promover el crecimiento de los plantines, evidenciándose por el aumento de los pesos frescos y secos de los mismos. En referencia a los diferentes índices de calidad de plantín utilizados, la inoculación del antagonista presentó diferentes efectos.

Para los índices de calidad de Esbeltez, Dickson y Supervivencia de plantines se observaron resultados positivos, para los índices Tallo-Raíz y Porcentaje de Raíces un efecto negativo. El índice de Lignificación fue el único que no presentó variación con la incorporación de *Trichoderma*. En el efecto de solubilización de nutrientes minerales *Trichoderma* presentó una buena tendencia, ya que la concentración de estos en las acículas aumenta. Sin embargo, se observaron efectos parcialmente negativos para los microminerales hierro y boro. El análisis isoenzimático fue el que presentó un comportamiento más desparejo. La respuesta de los plantines frente al agregado de *Trichoderma* exhibió dos padrones de actividad peroxidasa bien definidos, que se definen según los materiales genéticos y condiciones de migración electroforética utilizados. Sin perjuicio de lo anterior, se puede concluir que *Trichoderma* tuvo un efecto positivo en la inducción de resistencia a enfermedades, evidenciándose por la producción de proteínas con actividad peroxidasa. En último lugar, el estudio de la supervivencia del antagonista en el sustrato presentó resultados aceptables. La instalación y posterior supervivencia del hongo se mantuvieron en niveles razonables una vez transcurridos dos meses desde su incorporación, pero una vez cumplidos cinco meses, los niveles en el sustrato descienden considerablemente.

Palabras clave: Control biológico; *Trichoderma harzianum*; Plantín forestal; Índice de calidad; *Pinus taeda*; Peroxidasas.

## 7 SUMMARY

Studies on biological control of diseases, have positioned the fungus *Trichoderma* genus as one of the most promising biological control agents of diseases. One of the most significant characteristics featuring this genus, is based on the different mechanisms of action, leading to decrease the risk of emergence of resistant strains of pathogens. In this sense, there are local history (especially in the horticultural sector) that technique incorporating biological control of diseases as a tool within the production system. Thus, in the mid 90's, are the first works specifically within the forestry sector, framed in the nursery phase. Due to the great development that has been taking the forestry sector in the last years, there is increasing demand for quality seedlings, by different companies in the area for planting. Given the above background, this paper examines the agrees of incorporating Trichosoil® commercial product, the substrate for the production of a forest nursery. Of the different mechanisms of action presented by the genus *Trichoderma*, this paper assesses the growth promoting effect on plants, the induction of disease resistance and solubilization of mineral nutrients. The growth promoting effect on the seedlings are evaluated through quality, defined by different parameters: aerial part height, neck's diameter, fresh weight and dry weight, concentration of mineral nutrients and survival of seedlings. It also uses various index to determine the optimal quality of *Pinus taeda* (loblolly pine) seedlings for planting, among which are: slenderness ratio, shoot-root ratio, Dickson's quality index, index and percentage of root woody. The effect of induction of resistance in the seedlings is studied through isozyme analysis using the technique of protein electrophoresis with peroxidase activity. Finally, the solubilization of mineral nutrients is studied based on different leaf analysis done for the long production cycle of the seedlings. Finally, studied the survival of *Trichoderma harzianum* strain L1 (active substance of Trichosoil®), by counting colonies of the inoculated strain since the substrate production, until the seedlings are taken to the field. The results indicate that the inclusion of *Trichoderma harzianum* in the substrate had a positive effect on variables neck's diameter and height, increasing these parameters. In turn, it was proven the positive effect of *Trichoderma* in promoting the growth of the seedlings, as evidenced by the increase in fresh and dry weights of its. In reference to the different seedling quality index used, the inoculation of the antagonist showed different effects. For the Dickson's quality index, slenderness and survival of seedlings were observed positive results, for the percentage of roots and the shoot-root ratio a negative effect, and the woody index was indifferent. The effect of *Trichoderma* solubilization of mineral nutrients showed a good trend, because the concentration of these in the leaf increases. However, partially negative effects were observed for the

microminerals iron and boron. Finally, isozyme analysis was presented more uneven behavior. The response of the seedlings compared to the addition of *Trichoderma* patterns exhibited two well-defined peroxidase activity, defined as the genetic material and electrophoretic migration conditions used. Without prejudice to the foregoing, it can be concluded that *Trichoderma* had a positive effect on the induction of disease resistance, evidenced by the production of proteins with peroxidase activity. Finally the study of the survival of the antagonist on the substrate provided acceptable results. The installation and subsequent survival of the fungus were maintained at reasonable levels after two months of its incorporation, but after five months of age, levels decrease considerably in the substrate.

Keywords: Biological control; *Trichoderma harzianum*; Forest seedling; Quality index; *Pinus taeda*; Peroxidases.



## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G.N. 2004. Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed. San Diego, California, Elsevier/ Academic Press. 992 p.
2. AÑON, D.; LEVITAN, A.L.; TARINO, E. 2004. Evaluación de diferentes dosis de fertilización en la producción de plantines de *Pinus taeda* creciendo en sustrato colonizado por *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 125 p.
3. ALEXOPOULOS, C.J. 1966. Introducción a la micología. Buenos Aires, EUDEBA. 615 p.
4. ALÍA, R.; ALBA, N.; AGÚNDEZ, D.; IGLESIAS, S. 2005. Manual para la comercialización y producción de semillas y plantas forestales. Materiales de base y de reproducción. (en línea). Madrid, Dirección General Para la Biodiversidad. 384 p. (Serie Forestal). Consultado dic. 2010. Disponible en [http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/montes politica for estal/recursos geneticos forestal/pdf/libro semillasfi.pdf](http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/montes_politica_for_estal/recursos_geneticos_forestal/pdf/libro_semillasfi.pdf)
5. ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus. Applied and Environmental Microbiology. 65(7): 2926-2933.
6. ARAYA, E.; MURILLO, O.; AGUILAR, G.; ROCHA, O. 2005. Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal. (en línea). Kurú: Revista Forestal. 2(6): 1-14. Consultado ene. 2011. Disponible en [http://www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista\\_Kuru/anteriores/ant erior6/pdf/Nota%201.pdf](http://www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista_Kuru/anteriores/ant_erior6/pdf/Nota%201.pdf)
7. BAILEY, B.A.; LUNSDEN, R.D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Kubicek, C.H.; Harman, G.H. eds. *Trichoderma* and *Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. v.2, pp. 163-181.
8. BARBAZÁN, M. 1998. Análisis de plantas y síntomas visuales de deficiencia de nutrientes. Montevideo, Facultad de Agronomía. 27 p.

9. BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Straits. (en línea). International Microbiology. 7: 249-260. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/im/v7n4/Benitez.pdf>
10. BIRCHLER, T.; ROSE, R.W.; ROYO, A.; PARDOS, M. 1998. La planta ideal: Revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. (en línea). Sistemas y Recursos Forestales. 7(1): 109-121. Consultado dic. 2010. Disponible en [http://www.inia.es/gcontrec/pub/11.T.BIRCHLER\\_1047630290178.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/11.T.BIRCHLER_1047630290178.pdf)
11. BOLLER, E.; AVILLA, J.; JOERG, E.; MALAVOLTA, C.; WIJNANDS, F.G.; ESBJERG, P. 2004. Integrated production principles and technical guidelines. (en línea). IOBC. Bulletin 27(2): 49. Consultado dic. 2010. Disponible en [http://www.iobc-wprs.org/ip\\_ipm/01\\_IOBC\\_Principles\\_and\\_Tech\\_Guidelines\\_2004.pdf](http://www.iobc-wprs.org/ip_ipm/01_IOBC_Principles_and_Tech_Guidelines_2004.pdf)
12. 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.
13. CAMARENA, G. 2006. Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. (en línea). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 12(1): 25-30. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/629/62912103.pdf>
14. \_\_\_\_\_.; DE LA TORRE, R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. (en línea). Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 13(1): 157-162. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/629/62913209.pdf>
15. CÁRDENAS, D. 2003. Evaluación de diferentes sustratos colonizados con el antagonista (*Trichoderma harzianum* Fr.) sobre la calidad de plantines de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex Maiden., *Eucalyptus globulus* spp. *globulus* Labill. y *Pinus taeda* L. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 195 p.
16. CARNEIRO, J.G. 1995. Produção e controle de qualidade de mudas florestais. Curitiba, Universidade Federal do Paraná/Universidade

Estadual do Norte Fluminense. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná. 451 p.

17. COOK, R.J.; BAKER, K.F. 1984. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *Physiological Plant Pathology*. 25 (2): 254-256.
18. CÓPPOLA, F.; MENDOZA, G.; REGULES, H. 2000. Caracterización de plantines de *Eucalyptus* y *Pinus* desde el punto de vista de la calidad en el Uruguay. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 105 p.
19. DÍAZ, J.C.; TONELLO, U.; MARTÍNEZ, G.; SALAZAR, S. CHALFOUN, N.; VELLICCE, G. 2010. Aproximaciones biotecnológicas para un manejo sustentable del estrés fúngico en la agricultura. *In*: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. eds. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. s.l., INTA. pp. 467-480.
20. DONOSO, E.; LOBOS, G.A.; ROJAS, N. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. (en línea). *Bosque*. 29(1): 52-57. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v29n1/art06.pdf>
21. FAO. 2006. Manual de campo; plagas y enfermedades de Eucaliptos y Pinos en el Uruguay. s.l. 167 p.
22. FURNIER, G.R. 2004. Métodos para medir variación genética en las plantas. *In*: Vargas, J.J.; Bermejo, H.B.; Ledig, F.T. eds. *Manejo de recursos genéticos forestales*. Zapopan, Jalisco, Comisión Nacional Forestal. Colegio de Postgraduados. pp. 20-30.
23. GALLO, L.A.; MARCHELLI, P.; AZPILICUETA, M.M.; CREGO, P. 2006. El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. (en línea). *Bosque*. 27(1): 3-15. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v27n1/art01.pdf>
24. GAMS, W.; BISSETT, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. *In*: Kubicek, C.H.; Harman, G.H. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. v.2, pp. 3-34.
25. GARCÍA, M. 2006. Control y mejora de la calidad del proceso productivo. (en línea). *In*: Jornada de Difusión y Capacitación para Viveristas

- Forestales del Norte de Entre Ríos (2006, Concordia). Memorias. Concordia, INTA. s.p. Consultado dic. 2010. Disponible en [http://www.inta.gov.ar/concordia/info/documentos/Forestacion/Jornada%20para%20viveristas%20forestales\\_EEA%20Concordia%20julio%20de%202006.pdf](http://www.inta.gov.ar/concordia/info/documentos/Forestacion/Jornada%20para%20viveristas%20forestales_EEA%20Concordia%20julio%20de%202006.pdf)
26. \_\_\_\_\_. 2007. Importancia de la calidad del plantín forestal. (en línea). In: Jornadas Forestales de Entre Ríos (14<sup>o</sup>, 2007 INTA, Concordia). Memorias. Concordia, INTA. pp. 1-10. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/concordia/info/Forestales/contenido/pdf/2007/312.II.GARCIA.pdf>
27. GRONDONA, I.; HERMOSA, R.; TEJADA, M.; GOMIS, M.D.; MATEOS, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 63(8): 3189-3198. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168616/pdf/633189.pdf>
28. HANSBERG, W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. (en línea). Mensaje Bioquímico. 26: 19-54. Consultado ene. 2011. Disponible en [http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje\\_Bioq\\_02v26p019\\_Hansberg.pdf](http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq_02v26p019_Hansberg.pdf)
29. HARMAN, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. (en línea). Phytopathology. 96: 190-194. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.agrauxine.net/pdf/Harman,%202006.pdf>
30. IGLESIAS, L.; CASAS, J.L. 2004. Avances en la evaluación de la diversidad genética de especies forestales mediante el uso de marcadores isoenzimáticos. (en línea). Cuadernos de Biodiversidad. 15: 11-16. Consultado ene. 2011. Disponible en [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1114/1/cuadbiod15\\_2.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1114/1/cuadbiod15_2.pdf)
31. INFANTE, D.; MARTÍNEZ, B.; GONZÁLEZ, N.; REYES, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. (en línea). Revista Protección Vegetal. 24(1): 14-21. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>

32. JIMÉNEZ, P.; COLLADA, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. (en línea). Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales. Fuera de serie 2: 237-248. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://recyt.fecyt.es/index.php/IA/article/view/2665/2042>
33. KLEIN, D.; EVELEIGHT, D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.H.; Harman, G.H. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. v.2, pp. 57-74.
34. KUBIECK-PRANZ, E.M. 1998. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.H.; Harman, G.H. eds. *Trichoderma and Gliocladium*. London, UK, Taylor and Francis. v.2, pp. 95-119.
35. LANDIS, T.D. 1989. Mineral nutrients and fertilization. In: Landis, T.D.; Tinus, R.W.; McDonald, S.E.; Barnett, J.P. eds. *The container tree nursery manual*. Washington, D.C., USDA Forest Service. v.4, pp. 1-67.
36. LEDIG, F.T. 2004. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. In: Vargas, J.J.; Bermejo, H.B.; Ledig, F.T. eds. *Manejo de recursos genéticos forestales*. Zapopan, Jalisco, Comisión Nacional Forestal. Colegio de Postgraduados. pp. 3-18.
37. LOO, J. 2004. Manejo de germoplasma en programas de mejoramiento de árboles. In: Vargas, J.J.; Bermejo, H.B.; Ledig, F.T. eds. *Manejo de recursos genéticos forestales*. Zapopan, Jalisco, Comisión Nacional Forestal. Colegio de Postgraduados. pp. 44-57.
38. MADRIZ, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. (en línea). *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 22-32. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2097E/A2097E.PDF>
39. MARTÍNEZ, M.; HELGUERA, M.; CARRERA, A. 2010. Marcadores Moleculares. In: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. eds. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. s.l., INTA. pp. 70-85.
40. MAY, J.T. 1984. Nutrients and fertilization. In: Clark, W.L. ed. *Southern pine nursery handbook*. Atlanta, GA, USDA Forest Service. Southern Region. p. irr.

41. MÉTRAUX, J.P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica*. 124: 237-243.
42. MONDINO, P.; VERO, S. 2006. Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Facultad de Agronomía. 158 p.
43. NEGRONE, C.; LEÓN, M.I.; VILLALBA, N. 2008. Evaluación del comportamiento de plantines de *Pinus taeda* L. con y sin aplicación de fertilización starter creciendo en sustrato con *Trichoderma harzianum*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 85 p.
44. OLIVO, V.; BUDUBA G. 2006. Influencia de seis sustratos en el crecimiento de *Pinus ponderosa* producido en contenedores bajo condiciones de invernáculo. (en línea). *Bosque*. 27(3): 267-271. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v27n3/art07.pdf>
45. PRIETO, J. A.; CORNEJO, E. H.; DOMÍNGUEZ, P. A.; NÁVAR, J.; MARMOLEJO, M.; JIMÉNEZ, J. 2004. Estrés hídrico en *Pinus engelmannii* Carr., producido en vivero. (en línea). *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales*. 13(3): 443-451. Consultado dic. 2010. Disponible en [http://www.inia.es/gcontrec/pub/443-451-\(6704\)-Estres\\_1161947232765.pdf](http://www.inia.es/gcontrec/pub/443-451-(6704)-Estres_1161947232765.pdf)
46. RAMÍREZ, H.; CALDERÓN, A.; ROCA W.A. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: Roca, W.M.; Mroginski, L.A. eds. *Cultivos de tejidos en la agricultura*. Cali, Colombia, CATIE. pp. 825-855.
47. \_\_\_\_\_. 2003. Uso de isoenzimas en la caracterización de germoplasma vegetal. (en línea). *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*. 1(1): 80-82. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Art22.pdf>
48. RICHARDSON, B.J.; BAVERSTOCK, P.R.; ADAMS, M. 1986. *Allozyme Electrophoresis; a handbook for animal systematics and population studies*. Sydney, Australia, Academic Press. 410 p.
49. ROMANO, A. 2003. Las isoenzimas como marcadores moleculares: características, usos y aplicaciones prácticas. Trabajo especial 1, Licenciatura en Bioquímica. Montevideo, Facultad de Ciencias. 159 p.

50. SAMUELS, G.J. 2006. *Trichoderma*; systematics, the sexual state, and ecology. (en línea). *Phytopathology*. 96(2): 195-206. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/pdf/Samuels2006TrichodermaTaxonomy.pdf>
51. SHAW, C.R.; PRASAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*. 4: 297-320.
52. SCIENCE PHOTO LIBRARY. s.f. *Trichoderma*. (en línea). London, UK, Biophoto Associates/Science Photo Library. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www.sciencephoto.com/media/156723/enlarge>
53. SIGALA, J.A. 2009. Calidad de planta en diez viveros forestales del estado de Durango. (en línea). Tesis Licenciatura. Chapingo, Méjico. Universidad Autónoma Chapingo. División de Ciencias Forestales. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www.chapingo.mx/dicifo/?dcf=t2009>
54. SOLÍS, L.; IGLESIAS, L. 2001. Variación en la composición isoenzimática en la población de *Pinus hartwegii* Lindl del Pico de Orizaba, Veracruz. (en línea). *Cuadernos de Biodiversidad*. 8: 4-7. Consultado ene. 2011. Disponible en [http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1139/1/cuadbiod08\\_1.pdf](http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1139/1/cuadbiod08_1.pdf)
55. SOUZA-CHIES, T.T. 1992. Relacionamiento isoenzimático entre entidades taxonômica do gênero *Paspalum* (Gramineae), dissertação ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas. Porto Alegre, RS, Brasil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 176 p.
56. UNIVERSITY OF ADELAIDE. s.f. *Trichoderma harzianum*. (en línea). Adelaide, SA, Australia, University of Adelaide. Consultado dic. 2010. Disponible en [http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/hyaline\\_moulds/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/hyaline_moulds/)
57. USDA; FOREST SERVICE. s.f. Loblolly pine; *Pinus taeda*. (en línea). s.l., University of Georgia/USDA. Forest Service/International Society of Arboriculture. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1506027>
58. VAN LOON, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. (en línea). *European Journal of Plant*



Pathology. 103: 735-765. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://igitur-archive.library.uu.nl/bio/2001-1220-112648/EJPP-VanLoon-1997.pdf>

59. VAN WEES, S.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 433-448.
60. VELÁZQUEZ, B.B. 2004. Análisis de la estructura genética de árboles forestales. In: Vargas, J.J.; Bermejo, H.B.; Ledig, F.T. eds. Manejo de recursos genéticos forestales. Zapopan, Jalisco, Comisión Nacional Forestal. Colegio de Postgraduados. pp. 32-42.
61. VILLAR, P. 2003. Importancia de la calidad de planta en los proyectos de revegetación. (en línea). In: Nicolau, J.M.; Rey, J.M.; Espigares, T. eds. Restauración de ecosistemas mediterráneos. Madrid, Universidad de Alcalá de Henares. pp. 65-86. Consultado dic. 2010. Disponible en <http://www2.uah.es/pedrovillar/PDF/Texto%20publicado.pdf>
62. VIVIANCO, J.M.; COSIO, E.; LOYOLA-VARGAS, V.M.; FLORES, H.E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. (en línea). *Investigación y Ciencia*. 341: 68-75. Consultado ene. 2011. Disponible en <http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/Investigacion2005.pdf>
63. VOJNOV, A.; RIVERO, M.M.; ZAPPACOSTA, D. 2010. Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas. In: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. s.l., INTA. pp. 457-466.
64. WALTERS, D.; HELI, M. 2007. Cost and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 3-7.



## 9 ANEXOS

### 9.1 VARIABLES OBTENIDAS EN EL MUESTREO

#### 9.1.1 Diámetro y altura

<b>BANDEJA 1 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>						<b>BANDEJA 2 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3		Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,9	0,5	16,0	1,0	25,0	0,5	2,1	1,0	9,0	1,0	25,0
0,5	2,3	1,0	16,0	1,5	20,0	0,5	2,0	1,0	21,0	1,5	25,0
0,5	2,6	1,0	15,0	1,5	13,0	0,5	2,0	1,0	9,5	1,5	18,0
0,5	2,6	1,0	18,0	1,5	17,0	0,5	2,2	1,0	14,5	1,5	22,0
0,5	2,0	1,0	18,5	1,5	19,5	0,5	2,1	1,5	12,0	1,5	15,5
0,5	2,4	1,0	14,0	1,5	19,0	0,5	2,2	1,5	14,0	1,5	12,5
0,5	1,9	1,0	18,5	1,5	18,0	0,5	2,5	1,5	14,0	1,5	14,0
0,5	1,9	1,0	16,0	1,5	23,5	0,5	2,3	1,5	14,0	2,0	16,0
1,0	2,6	1,0	15,5	1,5	15,5	1,0	2,6	1,5	15,0	2,0	17,0
1,0	2,6	1,5	13,0	2,0	26,0	1,0	2,3	1,5	13,5	2,0	21,0
1,0	2,5	1,5	18,5	2,0	22,0	1,0	3,0	1,5	16,5	2,0	18,0
1,0	2,6	1,5	17,0	2,0	16,0	1,0	2,7	1,5	14,5	2,0	23,5
1,0	2,7	1,5	16,5	2,0	21,5	1,0	2,7	1,5	15,0	2,0	24,0
1,0	2,2	1,5	17,5	2,0	21,0	1,0	2,2	1,5	16,0	2,0	23,5
1,0	2,9	1,5	15,5	2,0	26,5	1,0	2,9	1,5	10,0	2,0	20,0
1,0	2,8	1,5	17,5	2,0	22,0	1,0	3,1	1,5	15,0	2,0	22,0
1,0	2,6	1,5	14,0	2,0	21,5	1,0	3,0	1,5	13,0	2,0	21,0
1,0	2,7	1,5	16,0	2,0	23,0	1,0	2,1	1,5	16,0	2,0	12,0
1,0	2,9	1,5	17,0	2,0	27,5	1,0	2,7	1,5	16,0	2,0	16,0
1,0	3,1	1,5	17,5	2,0	13,5	1,0	2,6	1,5	13,0	2,0	17,0
1,0	3,0	1,5	16,5	2,0	22,0	1,0	2,2	1,5	12,5	2,0	15,0
1,0	2,6	1,5	19,0	2,0	17,0	1,0	2,9	1,5	15,0	2,0	17,0
1,0	2,6	1,5	18,0	2,0	19,0	1,0	2,9	1,5	14,5	2,0	23,0
1,0	2,9	1,5	13,0	2,0	26,0	1,0	2,3	1,5	15,0	2,0	25,0
1,0	3,0	1,5	19,5	2,0	20,0	1,0	2,4	1,5	13,5	2,0	17,0

1,0	2,6	1,5	15,5	2,0	20,0
1,0	2,9	1,5	18,5	2,0	21,0
1,0	3,5	1,5	19,0	2,0	17,0
1,0	2,9	1,5	16,0	2,0	13,0
1,0	3,4	1,5	14,5	2,0	19,0
1,0	2,7	1,5	19,5	2,0	22,0
1,0	2,4	1,5	12,5	2,0	28,0
1,0	2,4	1,5	15,0	2,0	19,0
1,0	2,8	1,5	18,0	2,0	23,0
1,0	3,0	1,5	20,5	2,0	17,0
1,0	2,1	1,5	11,5	2,0	20,0
1,0	2,7	1,5	17,0	2,0	17,0
1,0	3,2	2,0	16,0	2,5	26,0
1,0	3,0	2,0	16,0	2,5	24,0
1,0	2,5	2,0	15,0	2,5	22,0
1,0	2,7	2,0	14,0	2,5	26,0
1,0	2,5	2,0	18,0	2,5	17,0
1,0	2,0	2,0	20,5	2,5	20,0
1,0	3,0	2,0	18,5	2,5	20,0
1,0	2,6	2,0	16,0	2,5	21,0
1,0	2,7	2,0	22,0	2,5	25,0
1,0	2,2	2,0	13,5	2,5	22,0
1,0	3,1	2,0	15,0	2,5	22,0
1,0	3,1	2,0	16,0	2,5	25,5
1,0	2,3	2,0	7,0	2,5	23,0
1,0	2,0	2,0	18,0	2,5	24,5
1,0	3,0	2,0	16,5	3,0	26,0
1,0	3,2	2,0	14,5	3,0	26,0
1,0	3,1	2,0	17,5	3,0	24,5
1,0	2,3	2,0	19,0	3,0	23,0
1,0	2,9	2,0	17,0	3,0	27,0
1,0	2,7	2,0	17,5	3,5	24,0
1,0	2,4	2,0	14,0	-	-
1,0	3,4	2,0	15,0	-	-
1,0	3,0	2,0	17,5	-	-
1,0	3,2	2,0	13,0	-	-
1,0	2,5	2,5	16,0	-	-
1,0	2,4	2,5	15,0	-	-
1,0	3,0	2,5	16,5	-	-
1,0	3,2	-	-	-	-

1,0	2,1	1,5	16,5	2,0	19,5
1,0	2,9	1,5	16,0	2,0	20,0
1,0	2,5	2,0	5,5	2,0	18,0
1,0	2,7	2,0	14,5	2,0	18,5
1,0	2,9	2,0	18,0	2,0	17,0
1,0	2,6	2,0	15,5	2,0	24,0
1,0	2,9	2,0	14,0	2,0	17,0
1,0	3,1	2,0	14,5	2,0	23,0
1,0	2,6	2,0	12,0	2,5	18,5
1,0	3,0	2,0	14,5	2,5	23,0
1,0	2,7	2,0	17,0	2,5	23,0
1,0	2,7	2,0	14,5	2,5	15,0
1,0	2,8	2,0	12,5	2,5	21,0
1,0	3,0	2,0	12,0	2,5	21,0
1,0	2,6	2,0	10,5	2,5	25,5
1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	24,0
1,0	2,7	2,0	13,0	2,5	20,0
1,0	2,6	2,0	13,5	2,5	21,0
1,0	2,6	2,0	16,0	2,5	23,0
1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	20,0
1,0	2,8	2,0	16,5	2,5	16,0
1,0	2,8	2,0	15,0	2,5	20,0
1,0	3,0	2,0	12,0	2,5	23,0
1,0	2,5	2,0	13,5	2,5	17,0
1,0	2,8	2,0	15,5	2,5	24,5
1,0	3,0	2,0	15,5	2,5	19,5
1,0	2,9	2,0	16,0	2,5	21,0
1,0	2,7	2,0	17,5	2,5	14,0
1,0	2,6	2,0	16,5	2,5	25,0
1,0	2,9	2,0	13,0	2,5	22,0
1,0	2,6	2,0	12,5	2,5	19,0
1,0	2,7	2,0	14,5	3,0	23,0
1,0	2,4	2,0	15,5	3,0	24,0
1,0	2,5	2,0	20,0	3,0	22,5
1,0	2,9	2,0	15,5	3,0	23,0
1,0	2,6	2,0	18,5	3,0	22,0
1,0	2,6	2,0	15,5	3,0	20,0
1,0	2,9	2,0	16,5	3,0	26,0
1,0	2,6	2,5	15,5	-	-
1,5	3,0	2,5	12,5	-	-

1,5	3,2	-	-	-	-
1,5	3,3	-	-	-	-
1,5	2,6	-	-	-	-

1,5	2,9	2,5	15,0	-	-
1,5	2,9	2,5	16,0	-	-
1,5	3,2	2,5	16,0	-	-
1,5	2,2	2,5	16,5	-	-
1,5	3,2	2,5	16,5	-	-
1,5	2,9	3,0	18,0	-	-
1,5	3,0	3,0	14,0	-	-

<b>BANDEJA 3 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	1,8	1,0	12,0	1,5	15,0
0,5	2,3	1,0	14,5	1,5	13,0
0,5	2,6	1,0	14,0	1,5	19,0
0,5	2,4	1,0	14,0	1,5	19,5
0,5	2,4	1,5	11,0	1,5	28,5
0,5	2,2	1,5	12,0	1,5	19,5
0,5	2,0	1,5	11,0	1,5	10,0
0,5	2,1	1,5	15,0	1,5	15,0
0,5	2,0	1,5	13,0	2,0	17,5
1,0	2,1	1,5	13,0	2,0	17,5
1,0	2,1	1,5	14,0	2,0	17,0
1,0	2,6	1,5	13,5	2,0	19,0
1,0	2,7	1,5	13,0	2,0	20,0
1,0	2,7	1,5	12,5	2,0	17,0
1,0	2,7	1,5	14,0	2,0	23,0
1,0	2,2	1,5	13,0	2,0	20,0
1,0	2,4	1,5	14,0	2,0	19,0
1,0	2,0	1,5	13,5	2,0	17,0
1,0	2,8	1,5	13,0	2,0	13,0
1,0	2,5	1,5	8,5	2,0	19,5
1,0	2,1	1,5	15,5	2,0	22,0
1,0	2,6	1,5	13,0	2,0	26,0
1,0	2,6	1,5	14,5	2,0	18,0
1,0	2,1	1,5	14,0	2,0	26,5
1,0	2,3	1,5	13,5	2,0	23,0
1,0	2,3	1,5	13,5	2,0	22,0
1,0	2,7	1,5	12,5	2,0	24,0
1,0	2,9	1,5	12,5	2,0	23,0

<b>BANDEJA 4 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,8	1,0	12,0	1,5	12,0
0,5	2,1	1,0	12,0	1,5	15,0
0,5	2,2	1,0	10,5	1,5	19,0
0,5	2,5	1,0	14,0	2,0	26,0
0,5	2,1	1,0	13,0	2,0	22,0
0,5	2,3	1,0	15,0	2,0	21,0
0,5	2,8	1,0	10,0	2,0	21,5
0,5	2,2	1,5	14,5	2,0	21,0
0,5	2,6	1,5	11,5	2,0	24,5
1,0	1,4	1,5	13,0	2,0	25,0
1,0	3,0	1,5	17,0	2,0	25,5
1,0	3,5	1,5	13,0	2,0	20,0
1,0	2,5	1,5	16,0	2,0	21,5
1,0	2,8	1,5	12,0	2,0	27,5
1,0	2,2	1,5	14,5	2,0	25,0
1,0	3,5	1,5	15,0	2,0	23,0
1,0	2,4	1,5	14,5	2,0	23,0
1,0	2,4	1,5	17,0	2,0	27,5
1,0	3,4	1,5	11,0	2,0	22,0
1,0	2,8	1,5	15,0	2,0	23,0
1,0	2,9	1,5	15,0	2,0	17,5
1,0	2,5	1,5	13,0	2,0	17,5
1,0	3,0	1,5	15,0	2,0	13,0
1,0	3,5	1,5	18,5	2,0	16,0
1,0	2,5	1,5	17,0	2,0	15,0
1,0	2,6	1,5	15,5	2,0	16,0
1,0	2,6	1,5	15,5	2,0	20,0
1,0	2,8	1,5	16,0	2,0	17,0

1,0	2,4	1,5	14,0	2,0	19,0
1,0	2,4	1,5	16,0	2,0	22,0
1,0	2,3	1,5	18,0	2,0	18,5
1,0	2,1	1,5	13,5	2,0	16,0
1,0	2,1	1,5	16,5	2,0	21,0
1,0	2,5	1,5	16,0	2,0	23,0
1,0	2,8	1,5	15,0	2,0	20,0
1,0	3,1	1,5	13,5	2,0	16,0
1,0	3,0	2,0	13,0	2,0	14,0
1,0	2,7	2,0	15,0	2,0	14,0
1,0	2,6	2,0	13,5	2,0	12,0
1,0	2,9	2,0	12,5	2,0	15,0
1,0	2,1	2,0	13,5	2,0	21,0
1,0	2,6	2,0	15,5	2,0	17,0
1,0	2,6	2,0	14,0	2,0	17,5
1,0	3,0	2,0	13,0	2,5	24,0
1,0	2,7	2,0	15,0	2,5	15,0
1,0	2,7	2,0	14,5	2,5	17,0
1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	17,0
1,0	2,9	2,0	14,5	2,5	17,0
1,0	2,1	2,0	17,0	2,5	19,0
1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	18,0
1,0	3,4	2,0	14,5	2,5	22,0
1,0	2,9	2,0	16,5	2,5	19,0
1,0	2,4	2,0	16,0	2,5	21,0
1,0	2,5	2,0	14,5	3,0	28,0
1,0	2,5	2,0	15,5	3,0	14,5
1,0	2,4	2,0	14,0	-	-
1,0	2,9	2,0	15,0	-	-
1,0	2,6	2,0	16,0	-	-
1,0	2,2	2,0	14,0	-	-
1,0	2,9	2,0	16,5	-	-
1,0	2,8	2,0	19,0	-	-
1,5	2,6	2,0	17,0	-	-
1,5	3,1	2,5	13,5	-	-
1,5	2,2	2,5	16,5	-	-
1,5	3,0	2,5	16,5	-	-
1,5	2,5	3,0	15,5	-	-

1,0	2,5	1,5	15,5	2,0	19,0
1,0	2,8	2,0	17,5	2,0	14,0
1,0	2,6	2,0	17,5	2,0	17,0
1,0	2,4	2,0	18,0	2,0	16,0
1,0	2,9	2,0	17,0	2,0	14,0
1,0	2,4	2,0	15,5	2,0	14,0
1,0	3,3	2,0	15,5	2,5	21,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	18,0
1,0	2,1	2,0	15,5	2,5	19,0
1,0	2,4	2,0	16,0	2,5	24,0
1,0	3,5	2,0	13,5	2,5	25,0
1,0	2,3	2,0	16,5	2,5	24,0
1,0	3,0	2,0	14,5	2,5	21,0
1,0	2,3	2,0	13,5	2,5	22,0
1,0	2,2	2,0	14,0	2,5	24,0
1,0	2,4	2,0	11,5	2,5	24,0
1,0	2,4	2,0	14,0	2,5	17,0
1,0	2,9	2,0	13,0	2,5	19,0
1,0	3,1	2,0	16,0	2,5	18,5
1,0	3,3	2,0	14,5	2,5	16,0
1,0	2,1	2,0	13,0	2,5	20,0
1,0	3,3	2,0	12,0	2,5	17,0
1,0	3,1	2,0	14,5	2,5	18,0
1,0	3,3	2,0	17,5	2,5	19,5
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	18,0
1,0	2,7	2,0	9,5	2,5	21,0
1,0	3,0	2,0	18,0	3,0	23,0
1,0	2,8	2,0	15,5	3,0	23,0
1,0	3,6	2,0	13,5	3,0	26,0
1,0	3,1	2,0	17,0	3,5	32,0
1,0	3,1	2,0	18,5	-	-
1,0	3,6	2,0	15,0	-	-
1,0	2,5	2,0	15,0	-	-
1,5	2,5	2,0	16,0	-	-
1,5	2,5	2,0	14,0	-	-
1,5	3,4	2,0	19,5	-	-
1,5	3,6	2,5	16,5	-	-
1,5	2,8	2,5	11,0	-	-
1,5	3,1	-	-	-	-

<b>BANDEJA 5 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,0	0,5	4,0	1,5	19,5
0,5	2,2	1,0	13,0	1,5	25,0
0,5	2,1	1,0	15,5	2,0	26,0
0,5	2,4	1,0	13,0	2,0	14,0
0,5	2,3	1,0	14,0	2,0	26,0
0,5	2,3	1,5	7,0	2,0	18,5
0,5	3,2	1,5	15,0	2,0	19,5
1,0	2,2	1,5	17,0	2,0	21,0
1,0	1,9	1,5	16,5	2,0	22,0
1,0	2,3	1,5	12,5	2,0	21,0
1,0	2,4	1,5	13,5	2,0	21,5
1,0	2,5	1,5	13,0	2,0	18,0
1,0	2,1	1,5	15,5	2,0	16,0
1,0	3,3	1,5	13,0	2,0	16,0
1,0	2,2	1,5	14,5	2,0	17,0
1,0	2,6	1,5	15,0	2,0	26,0
1,0	2,1	1,5	14,5	2,0	21,5
1,0	2,4	1,5	13,0	2,0	21,0
1,0	1,9	1,5	13,5	2,0	21,0
1,0	2,1	1,5	16,0	2,5	26,0
1,0	2,1	1,5	14,0	2,5	25,0
1,0	2,1	1,5	14,0	2,5	18,0
1,0	2,3	1,5	16,5	2,5	25,0
1,0	3,4	1,5	13,5	2,5	27,0
1,0	2,5	1,5	16,0	2,5	24,5
1,0	2,5	1,5	12,0	2,5	22,0
1,0	2,2	1,5	13,5	2,5	22,0
1,0	2,4	1,5	14,0	2,5	16,5
1,0	2,6	1,5	15,0	2,5	21,0
1,0	2,8	1,5	17,0	2,5	25,5
1,0	3,0	2,0	16,0	2,5	23,0
1,0	2,1	2,0	17,0	2,5	26,0
1,0	2,8	2,0	16,0	2,5	18,0
1,0	2,5	2,0	12,5	2,5	24,0
1,0	2,4	2,0	17,0	2,5	22,0
1,0	2,9	2,0	15,0	2,5	23,0

<b>BANDEJA 6 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,1	1,0	4,5	1,5	20,0
0,5	2,2	1,0	11,5	1,5	19,0
0,5	2,0	1,0	12,5	1,5	18,0
0,5	2,2	1,0	12,5	1,5	19,5
0,5	2,1	1,0	12,0	1,5	19,0
0,5	2,0	1,0	13,5	1,5	20,0
0,5	2,5	1,0	11,0	1,5	19,0
0,5	1,9	1,0	11,5	2,0	20,0
0,5	2,5	1,0	11,0	2,0	15,0
1,0	2,3	1,0	10,0	2,0	21,0
1,0	2,6	1,0	8,0	2,0	17,0
1,0	2,3	1,5	17,0	2,0	18,0
1,0	2,1	1,5	15,0	2,0	18,0
1,0	2,5	1,5	15,5	2,0	19,0
1,0	2,0	1,5	15,0	2,0	18,0
1,0	2,6	1,5	14,0	2,0	14,0
1,0	2,7	1,5	15,0	2,0	17,0
1,0	2,2	1,5	15,0	2,0	17,0
1,0	2,2	1,5	11,5	2,0	19,5
1,0	2,6	1,5	13,5	2,0	13,0
1,0	2,6	1,5	14,0	2,0	17,0
1,0	2,1	1,5	14,5	2,0	17,0
1,0	2,4	1,5	12,5	2,0	16,0
1,0	2,1	1,5	15,0	2,0	14,0
1,0	2,2	1,5	15,0	2,0	14,5
1,0	2,3	1,5	12,0	2,5	19,0
1,0	2,8	1,5	14,5	2,5	23,0
1,0	2,3	2,0	13,0	2,5	20,0
1,0	2,4	2,0	5,5	2,5	18,0
1,0	2,8	2,0	17,5	2,5	19,5
1,0	3,0	2,0	16,0	2,5	19,0
1,0	2,7	2,0	16,5	2,5	20,5
1,0	2,7	2,0	15,5	2,5	16,0
1,0	2,1	2,0	17,5	2,5	14,0
1,0	2,3	2,0	15,5	2,5	13,0
1,0	2,4	2,0	14,0	3,0	21,0

1,0	2,4	2,0	16,0	2,5	23,5
1,0	2,5	2,0	15,0	3,0	23,0
1,0	2,9	2,0	17,5	3,0	22,5
1,0	2,6	2,0	15,5	3,0	25,5
1,0	2,7	2,0	14,5	3,0	23,0
1,0	4,2	2,0	15,0	3,0	21,5
1,0	3,1	2,0	14,0	3,0	23,0
1,0	2,4	2,0	13,5	3,0	26,0
1,0	3,7	2,0	16,5	3,5	26,5
1,0	2,7	2,0	15,5	3,5	32,0
1,0	2,8	2,0	13,0	3,5	24,0
1,0	2,5	2,0	16,0	-	-
1,0	2,9	2,0	15,0	-	-
1,0	2,9	2,0	12,0	-	-
1,0	2,4	2,0	14,0	-	-
1,0	2,6	2,0	14,5	-	-
1,0	2,2	2,0	13,0	-	-
1,0	2,5	2,0	19,0	-	-
1,5	2,3	2,0	17,5	-	-
1,5	3,0	3,0	16,0	-	-

1,0	2,9	2,0	14,0	3,0	24,5
1,0	3,1	2,0	14,0	-	-
1,0	3,3	2,0	16,0	-	-
1,0	2,6	2,0	16,0	-	-
1,0	2,9	2,0	16,0	-	-
1,0	3,1	2,0	18,5	-	-
1,5	3,0	2,0	11,5	-	-
1,5	3,0	2,0	15,5	-	-
1,5	3,1	2,0	15,0	-	-
1,5	2,9	2,5	21,0	-	-
1,5	4,3	-	-	-	-
1,5	3,2	-	-	-	-

<b>BANDEJA 7 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,9	0,5	7,0	1,5	24,0
0,5	1,9	0,5	10,0	1,5	23,5
0,5	2,0	1,5	15,5	1,5	24,0
0,5	2,8	1,5	15,0	1,5	23,5
0,5	2,4	1,5	16,0	1,5	16,0
0,5	2,1	1,5	15,5	1,5	23,0
0,5	1,8	1,5	16,0	1,5	16,0
0,5	2,3	1,5	18,0	1,5	20,0
0,5	2,4	1,5	15,0	1,5	18,0
1,0	2,5	1,5	12,0	2,0	19,0
1,0	3,2	1,5	11,0	2,0	25,0
1,0	2,8	1,5	16,0	2,0	18,0
1,0	2,9	1,5	16,0	2,0	21,0
1,0	2,3	1,5	17,0	2,0	22,0
1,0	2,8	1,5	16,0	2,0	24,0

<b>BANDEJA 8 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,1	1,0	13,5	1,0	18,0
0,5	2,3	1,0	16,5	1,5	19,5
0,5	2,2	1,5	15,5	1,5	25,0
0,5	2,4	1,5	14,5	1,5	25,0
0,5	2,5	1,5	16,5	1,5	15,0
0,5	1,6	1,5	14,0	1,5	19,5
1,0	3,1	1,5	14,5	1,5	10,0
1,0	2,5	1,5	15,0	1,5	19,0
1,0	3,0	1,5	18,0	1,5	25,0
1,0	3,0	1,5	19,0	2,0	26,0
1,0	2,4	1,5	15,5	2,0	21,0
1,0	2,6	1,5	18,5	2,0	21,5
1,0	1,9	1,5	14,0	2,0	18,0
1,0	2,8	1,5	16,0	2,0	16,0
1,0	2,1	1,5	16,0	2,0	26,0

1,0	2,4	1,5	14,5	2,0	22,0
1,0	1,5	2,0	16,0	2,0	23,0
1,0	2,4	2,0	17,0	2,0	23,5
1,0	2,4	2,0	14,5	2,0	19,0
1,0	2,4	2,0	15,0	2,0	19,5
1,0	2,5	2,0	18,0	2,0	23,0
1,0	3,0	2,0	5,5	2,0	24,5
1,0	2,5	2,0	14,5	2,0	25,0
1,0	2,6	2,0	16,5	2,0	21,0
1,0	2,6	2,0	17,5	2,0	24,0
1,0	2,4	2,0	18,0	2,0	18,0
1,0	2,6	2,0	14,0	2,0	21,5
1,0	2,1	2,0	16,5	2,0	22,0
1,0	2,5	2,0	17,5	2,0	23,0
1,0	1,9	2,0	17,0	2,0	28,0
1,0	2,4	2,0	18,0	2,0	25,5
1,0	2,4	2,0	17,5	2,0	26,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,0	26,0
1,0	2,2	2,0	18,0	2,0	19,0
1,0	2,3	2,0	15,5	2,0	23,0
1,0	3,1	2,0	15,5	2,0	28,0
1,0	2,2	2,0	17,5	2,0	23,0
1,0	2,9	2,0	18,0	2,0	23,0
1,0	2,4	2,0	17,5	2,0	29,5
1,0	2,2	2,0	16,5	2,5	25,0
1,0	2,7	2,0	19,0	2,5	26,0
1,0	2,3	2,0	20,0	2,5	21,0
1,0	2,2	2,0	16,0	2,5	26,0
1,0	2,5	2,0	15,5	2,5	24,0
1,0	3,2	2,0	18,0	2,5	19,0
1,0	2,9	2,0	15,5	2,5	21,0
1,0	2,9	2,0	16,0	2,5	25,0
1,0	2,5	2,0	16,0	2,5	24,0
1,0	3,2	2,0	18,0	2,5	19,0
1,0	3,1	2,0	18,0	2,5	26,5
1,0	3,1	2,0	19,0	2,5	24,5
1,0	2,8	2,0	19,5	3,0	28,0
1,0	3,0	2,5	19,0	3,0	25,5
1,0	2,5	2,5	15,0	3,0	27,0
1,0	2,4	2,5	19,5	3,0	27,0

1,0	2,9	1,5	16,0	2,0	21,5
1,0	2,9	1,5	16,5	2,0	21,5
1,0	2,9	1,5	16,0	2,0	21,5
1,0	2,2	1,5	15,0	2,0	24,0
1,0	2,3	1,5	19,0	2,0	24,0
1,0	3,1	1,5	14,0	2,0	21,5
1,0	3,2	1,5	17,5	2,0	22,5
1,0	2,6	2,0	16,0	2,0	26,0
1,0	2,9	2,0	17,5	2,0	20,0
1,0	2,6	2,0	16,0	2,0	26,0
1,0	2,9	2,0	13,5	2,0	26,5
1,0	3,2	2,0	15,0	2,0	22,0
1,0	2,5	2,0	14,0	2,0	16,0
1,0	2,9	2,0	15,0	2,0	15,0
1,0	2,6	2,0	17,0	2,0	21,0
1,0	3,0	2,0	16,0	2,0	14,0
1,0	2,6	2,0	17,5	2,0	17,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,0	20,0
1,0	3,2	2,0	14,5	2,0	17,0
1,0	3,5	2,0	15,0	2,0	14,0
1,0	2,8	2,0	18,0	2,0	21,0
1,0	2,8	2,0	17,5	2,0	24,5
1,0	2,6	2,0	15,0	2,0	19,0
1,0	2,2	2,0	19,0	2,0	14,0
1,0	2,9	2,0	17,0	2,0	19,0
1,0	2,7	2,0	19,0	2,5	18,0
1,0	3,2	2,0	17,5	2,5	22,0
1,0	2,1	2,0	18,0	2,5	23,5
1,0	2,5	2,0	17,0	2,5	18,0
1,0	2,9	2,0	13,0	2,5	28,0
1,0	2,5	2,0	15,0	2,5	21,5
1,0	2,8	2,0	16,0	2,5	22,0
1,0	2,8	2,0	17,5	2,5	19,0
1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	23,0
1,0	2,5	2,0	13,0	2,5	24,0
1,0	2,8	2,0	15,0	2,5	20,0
1,0	2,8	2,0	16,0	2,5	16,0
1,0	2,9	2,0	15,5	2,5	23,0
1,0	3,0	2,0	16,0	2,5	21,0
1,0	2,9	2,0	16,5	2,5	26,0

1,0	2,5	2,5	19,0	3,0	29,0
1,0	2,5	2,5	16,5	3,0	26,5
1,0	2,2	2,5	16,5	-	-
1,0	2,0	2,5	17,0	-	-
1,0	2,5	2,5	19,0	-	-
1,0	2,3	2,5	18,0	-	-
1,0	2,6	2,5	17,5	-	-
1,5	2,9	3,0	18,0	-	-
1,5	3,1	3,0	19,0	-	-
1,5	2,9	3,0	18,5	-	-
1,5	3,3	3,0	20,5	-	-
1,5	3,3	-	-	-	-
1,5	3,5	-	-	-	-
1,5	3,1	-	-	-	-
1,5	2,7	-	-	-	-

1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	24,0
1,0	2,8	2,0	14,0	3,0	23,0
1,0	2,9	2,0	15,0	3,5	24,0
1,5	3,4	2,0	18,0	-	-
1,5	3,1	2,0	13,0	-	-
1,5	3,1	2,0	17,5	-	-
1,5	3,3	2,5	14,0	-	-
1,5	3,5	2,5	17,5	-	-
1,5	3,6	2,5	17,5	-	-
1,5	3,0	2,5	18,0	-	-

<b>BANDEJA 9 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	1,5	0,5	6,0	1,0	18,0
0,5	1,6	0,5	7,0	1,5	20,0
0,5	2,0	0,5	6,0	1,5	13,0
0,5	2,2	0,5	6,0	1,5	27,0
0,5	2,2	0,5	5,5	1,5	23,0
0,5	2,0	1,0	11,5	1,5	21,0
0,5	2,2	1,0	8,0	1,5	17,0
1,0	2,3	1,0	10,5	1,5	12,0
1,0	2,4	1,0	12,0	1,5	25,0
1,0	2,6	1,0	9,5	2,0	17,0
1,0	2,3	1,0	11,0	2,0	17,0
1,0	3,0	1,0	11,0	2,0	22,0
1,0	3,2	1,0	12,0	2,0	28,0
1,0	3,0	1,0	8,0	2,0	28,0
1,0	2,6	1,0	9,0	2,0	24,0
1,0	2,3	1,0	8,5	2,0	21,5
1,0	2,7	1,0	7,5	2,0	24,0
1,0	2,7	1,0	8,5	2,0	24,0
1,0	3,2	1,0	10,5	2,0	21,5
1,0	2,8	1,0	9,0	2,0	21,5

<b>BANDEJA 10 (SIN <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,3	1,0	12,0	1,5	19,5
0,5	2,0	1,0	14,0	1,5	21,0
0,5	2,0	1,0	14,0	1,5	15,0
0,5	2,0	1,0	15,0	1,5	13,0
0,5	2,0	1,0	11,0	1,5	15,0
0,5	2,5	1,0	13,5	1,5	19,0
1,0	2,7	1,0	12,0	1,5	23,5
1,0	3,1	1,0	13,5	1,5	18,0
1,0	2,5	1,5	15,0	2,0	22,0
1,0	3,0	1,5	15,0	2,0	18,0
1,0	2,9	1,5	17,5	2,0	22,0
1,0	2,9	1,5	15,5	2,0	18,0
1,0	3,0	1,5	16,5	2,0	16,0
1,0	2,7	1,5	14,0	2,0	20,0
1,0	2,3	1,5	15,0	2,0	21,5
1,0	3,8	1,5	15,5	2,0	24,0
1,0	2,5	1,5	13,5	2,0	25,0
1,0	2,4	1,5	15,0	2,0	22,0
1,0	2,2	1,5	14,5	2,0	19,0
1,0	3,1	1,5	16,5	2,0	17,0



1,0	2,7	1,0	5,5	2,0	24,0
1,0	2,8	1,0	11,0	2,0	27,5
1,0	2,2	1,0	8,0	2,0	22,0
1,0	3,2	1,0	8,0	2,0	28,5
1,0	2,8	1,0	9,0	2,0	13,5
1,0	2,8	1,0	10,5	2,0	22,0
1,0	3,2	1,5	10,0	2,0	22,0
1,0	2,4	1,5	13,5	2,0	23,0
1,0	2,8	1,5	10,0	2,0	23,0
1,0	3,0	1,5	10,5	2,0	27,5
1,0	4,0	1,5	12,0	2,0	22,5
1,0	2,5	1,5	10,0	2,0	26,0
1,0	2,2	1,5	7,5	2,0	20,0
1,0	2,7	1,5	8,0	2,0	22,0
1,0	2,9	1,5	8,0	2,0	30,0
1,0	2,4	1,5	10,0	2,0	22,0
1,0	2,9	1,5	9,5	2,5	25,0
1,0	2,7	1,5	9,5	2,5	23,0
1,0	2,7	1,5	13,5	2,5	23,0
1,0	2,4	1,5	9,0	2,5	24,0
1,0	2,6	1,5	11,0	2,5	21,5
1,0	2,7	1,5	12,0	2,5	27,5
1,0	2,7	1,5	10,5	2,5	25,0
1,0	2,0	1,5	10,0	2,5	25,0
1,0	3,1	1,5	9,0	2,5	24,5
1,0	2,9	1,5	10,5	3,0	22,0
1,0	2,5	2,0	15,0	3,0	24,0
1,0	2,3	2,0	11,0	-	-
1,0	2,6	2,0	16,0	-	-
1,0	3,0	2,0	6,5	-	-
1,5	3,2	2,0	11,5	-	-
1,5	3,2	2,0	13,0	-	-
1,5	2,5	2,0	16,0	-	-
1,5	3,4	2,0	15,0	-	-
1,5	3,0	2,0	12,0	-	-
1,5	3,0	2,0	14,5	-	-

1,0	2,9	1,5	14,0	2,0	17,0
1,0	2,7	1,5	15,0	2,0	19,0
1,0	2,7	1,5	15,0	2,0	13,0
1,0	2,9	1,5	13,0	2,0	13,0
1,0	2,8	1,5	13,0	2,0	14,5
1,0	3,0	1,5	14,0	2,0	24,0
1,0	2,8	1,5	14,0	2,0	23,0
1,0	2,9	2,0	12,5	2,0	23,0
1,0	1,6	2,0	12,0	2,0	20,0
1,0	2,7	2,0	19,0	2,0	13,0
1,0	2,7	2,0	16,0	2,0	17,0
1,0	3,0	2,0	16,5	2,5	23,5
1,0	2,9	2,0	14,0	2,5	23,5
1,0	2,6	2,0	18,0	2,5	27,0
1,0	2,5	2,0	16,0	2,5	18,0
1,0	4,2	2,0	15,0	2,5	16,5
1,0	2,5	2,0	16,0	2,5	23,5
1,0	2,9	2,0	16,0	2,5	23,0
1,0	2,9	2,0	14,5	2,5	27,5
1,0	2,4	2,0	15,0	2,5	24,5
1,0	2,3	2,0	18,0	2,5	22,0
1,0	2,3	2,0	18,0	2,5	24,0
1,0	2,8	2,0	13,0	2,5	15,0
1,0	2,3	2,0	15,0	2,5	19,0
1,0	2,3	2,0	13,0	2,5	20,5
1,0	2,8	2,0	14,5	2,5	26,0
1,0	3,0	2,0	8,0	2,5	24,0
1,0	2,6	2,0	14,0	2,5	24,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	21,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	21,0
1,0	2,9	2,0	14,5	2,5	21,0
1,0	3,0	2,0	14,0	2,5	20,0
1,0	2,6	2,0	18,0	3,0	23,0
1,0	2,7	2,0	14,0	3,0	22,0
1,0	2,7	2,0	15,0	3,0	20,0
1,0	2,8	2,0	15,0	3,0	21,0
1,0	3,1	2,0	17,5	3,0	26,0
1,0	3,4	2,0	15,5	-	-
1,0	3,2	2,0	15,0	-	-
1,5	3,0	2,0	15,5	-	-

1,5	3,0	2,0	17,5	-	-
1,5	3,2	2,0	14,5	-	-
1,5	3,2	2,0	16,0	-	-
1,5	3,0	2,0	17,5	-	-
1,5	2,2	2,0	16,0	-	-
1,5	3,0	2,0	17,0	-	-
1,5	2,8	2,0	17,0	-	-
1,5	3,2	2,0	14,5	-	-

<b>BANDEJA 11 (CON <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,5	1,0	12,5	1,5	13,5
0,5	2,0	1,0	10,0	1,5	18,0
0,5	2,4	1,0	8,0	1,5	18,0
0,5	2,6	1,5	18,0	2,0	17,0
0,5	2,6	1,5	19,0	2,0	17,0
0,5	3,0	1,5	13,0	2,0	16,0
0,5	2,3	1,5	20,0	2,0	21,5
0,5	2,5	1,5	18,5	2,0	15,0
0,5	2,2	1,5	17,5	2,0	15,0
1,0	2,6	1,5	20,0	2,0	21,0
1,0	2,2	1,5	16,5	2,0	13,0
1,0	2,8	1,5	19,5	2,0	18,5
1,0	3,1	1,5	14,5	2,0	19,0
1,0	3,1	1,5	14,0	2,0	17,5
1,0	2,6	1,5	19,0	2,0	18,0
1,0	2,5	1,5	16,5	2,0	18,0
1,0	2,9	1,5	10,0	2,0	19,0
1,0	2,6	2,0	19,0	2,0	15,0
1,0	2,4	2,0	21,0	2,0	18,5
1,0	2,5	2,0	19,5	2,5	22,0
1,0	2,5	2,0	20,0	2,5	17,0
1,0	2,6	2,0	18,0	2,5	19,0
1,0	2,5	2,0	18,0	2,5	17,5
1,0	2,7	2,0	22,0	2,5	19,0
1,0	2,0	2,0	21,5	2,5	19,0
1,0	2,9	2,0	18,0	2,5	24,0

<b>BANDEJA 12 (CON <i>Trichoderma</i>)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,6	1,0	11,5	1,5	18,5
0,5	2,6	1,0	10,0	2,0	24,0
0,5	2,3	1,0	9,0	2,0	17,5
0,5	2,8	1,5	13,0	2,0	18,0
0,5	3,0	1,5	12,5	2,0	25,0
0,5	2,0	1,5	13,0	2,0	23,0
0,5	2,4	1,5	13,5	2,0	19,0
0,5	2,5	1,5	17,5	2,0	23,0
1,0	2,5	1,5	13,0	2,0	20,0
1,0	3,1	1,5	14,0	2,0	23,5
1,0	3,5	1,5	13,0	2,0	18,0
1,0	3,3	1,5	13,5	2,0	22,0
1,0	2,7	1,5	12,0	2,0	26,0
1,0	2,7	1,5	9,0	2,0	24,0
1,0	2,8	1,5	12,0	2,0	19,0
1,0	3,1	1,5	11,0	2,0	24,0
1,0	3,1	1,5	12,0	2,0	18,0
1,0	2,9	1,5	14,0	2,0	21,0
1,0	2,6	1,5	12,5	2,0	25,0
1,0	2,7	1,5	12,0	2,0	17,0
1,0	3,1	1,5	14,0	2,0	21,5
1,0	2,9	1,5	14,0	2,5	27,0
1,0	3,0	1,5	19,0	2,5	26,0
1,0	2,8	1,5	9,5	2,5	24,0
1,0	2,1	2,0	14,5	2,5	26,0
1,0	2,3	2,0	17,0	2,5	28,0

1,0	3,1	2,0	18,0	2,5	16,0
1,0	3,3	2,0	15,0	2,5	22,0
1,0	3,1	2,0	16,5	2,5	22,0
1,0	2,9	2,0	15,0	2,5	17,5
1,0	3,1	2,0	17,0	2,5	18,5
1,0	3,4	2,0	17,5	2,5	17,0
1,0	2,1	2,0	20,0	2,5	20,0
1,0	2,8	2,0	18,5	2,5	13,5
1,0	2,8	2,0	18,0	2,5	19,5
1,0	3,0	2,0	16,0	2,5	19,0
1,0	2,9	2,0	19,5	2,5	22,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	24,0
1,0	2,9	2,0	20,0	2,5	19,0
1,0	2,7	2,0	20,5	2,5	15,0
1,0	3,1	2,0	17,0	2,5	16,5
1,0	2,1	2,0	16,5	3,0	20,5
1,0	2,0	2,0	17,0	3,0	19,0
1,0	2,3	2,0	18,5	3,0	28,0
1,0	2,8	2,0	19,5	3,0	22,0
1,0	2,7	2,0	16,0	3,0	17,5
1,0	2,9	2,0	19,0	3,0	18,0
1,0	3,0	2,0	17,0	3,0	26,5
1,0	3,0	2,0	18,0	3,0	19,0
1,0	3,2	2,0	17,5	3,0	22,5
1,0	3,1	2,0	21,5	3,5	17,5
1,0	3,5	2,5	21,0	3,5	23,0
1,0	3,4	2,5	20,0	3,5	18,5
1,0	3,0	2,5	20,5	3,5	18,0
1,0	3,0	2,5	20,0	3,5	21,0
1,0	2,5	2,5	21,5	3,5	24,0
1,5	3,1	2,5	17,5	4,0	22,0
1,5	3,1	2,5	21,0	4,0	21,5
1,5	3,1	2,5	17,5	4,0	23,0
1,5	3,0	2,5	17,0	-	-
1,5	2,6	2,5	18,0	-	-
1,5	2,4	2,5	19,0	-	-
1,5	3,0	3,0	22,5	-	-
1,5	1,9	3,0	22,0	-	-
1,5	3,0	3,0	22,0	-	-
1,5	2,8	3,0	20,5	-	-

1,0	2,8	2,0	14,5	2,5	25,0
1,0	1,9	2,0	15,5	2,5	19,0
1,0	2,1	2,0	15,0	2,5	25,0
1,0	3,1	2,0	17,5	2,5	23,0
1,0	2,7	2,0	14,5	2,5	19,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	19,5
1,0	3,1	2,0	16,5	2,5	22,0
1,0	2,7	2,0	14,0	2,5	21,0
1,0	3,0	2,0	19,0	2,5	22,0
1,0	2,5	2,0	16,0	2,5	21,0
1,0	2,0	2,0	15,0	2,5	18,0
1,0	2,1	2,0	15,0	2,5	23,0
1,0	2,5	2,0	17,0	2,5	32,0
1,0	2,8	2,0	14,0	3,0	28,0
1,0	3,0	2,0	16,0	3,0	23,0
1,0	2,6	2,0	14,0	3,0	24,5
1,0	2,9	2,0	15,0	3,0	23,0
1,0	2,8	2,0	13,0	3,0	26,0
1,0	2,4	2,0	14,0	3,0	20,0
1,0	2,4	2,0	14,5	3,0	20,0
1,0	2,8	2,0	12,0	3,0	20,0
1,0	2,1	2,0	18,0	3,0	25,0
1,0	2,3	2,0	13,0	3,0	20,5
1,0	1,8	2,0	14,5	3,5	20,0
1,0	3,3	2,0	16,5	3,5	27,5
1,0	2,1	2,0	13,5	3,5	19,0
1,0	2,6	2,0	13,5	3,5	23,0
1,0	3,5	2,0	14,0	3,5	27,0
1,0	2,9	2,0	14,5	3,5	30,0
1,0	2,6	2,0	14,5	3,5	24,5
1,0	3,1	2,0	13,5	4,0	28,0
1,0	2,9	2,0	14,0	4,0	27,5
1,0	3,0	2,0	17,0	4,0	23,0
1,0	2,5	2,0	13,5	4,0	25,0
1,0	2,6	2,0	14,5	-	-
1,0	2,5	2,0	14,0	-	-
1,5	4,1	2,0	16,0	-	-
1,5	2,5	2,0	16,0	-	-
1,5	3,1	2,5	19,5	-	-
1,5	2,4	2,5	18,5	-	-

1,5	3,1	2,5	16,0	-	-
1,5	2,5	2,5	17,0	-	-
1,5	3,5	2,5	17,0	-	-
1,5	2,6	-	-	-	-

<b>BANDEJA 13 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,4	1,5	11,5	1,5	28,5
0,5	2,1	1,5	15,5	2,0	27,0
0,5	2,6	1,5	12,0	2,0	26,0
0,5	2,1	1,5	14,0	2,0	28,0
0,5	2,2	1,5	11,0	2,0	32,0
1,0	2,1	1,5	12,5	2,0	26,0
1,0	2,6	1,5	13,5	2,0	32,0
1,0	2,5	1,5	10,5	2,0	29,0
1,0	2,3	1,5	13,0	2,0	24,0
1,0	2,3	1,5	12,0	2,0	30,0
1,0	2,0	1,5	11,5	2,0	25,0
1,0	2,0	2,0	13,5	2,0	19,5
1,0	2,5	2,0	16,5	2,0	29,5
1,0	3,1	2,0	13,0	2,5	27,0
1,0	2,6	2,0	14,0	2,5	26,0
1,0	2,8	2,0	15,5	2,5	27,0
1,0	2,8	2,0	12,0	2,5	18,0
1,0	2,8	2,0	12,0	2,5	19,0
1,0	2,6	2,0	13,5	2,5	27,0
1,0	1,9	2,0	12,5	2,5	29,0
1,0	2,3	2,0	12,5	2,5	34,0
1,0	2,1	2,0	14,0	2,5	31,0
1,0	2,6	2,0	14,5	2,5	23,0
1,0	2,5	2,0	14,0	2,5	20,0
1,0	2,2	2,0	13,5	2,5	20,0
1,0	2,8	2,0	16,5	2,5	20,0
1,0	2,9	2,0	15,5	2,5	27,0
1,0	2,3	2,0	15,5	2,5	24,0
1,0	2,4	2,0	13,0	2,5	24,0
1,0	2,9	2,0	14,0	2,5	32,0

<b>BANDEJA 14 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	3,3	0,5	6,0	1,5	19,5
0,5	2,7	0,5	9,5	1,5	21,0
0,5	2,4	1,0	9,0	2,0	24,0
0,5	2,5	1,0	11,0	2,0	23,0
1,0	2,9	1,0	11,0	2,0	19,0
1,0	2,5	1,0	13,0	2,0	26,0
1,0	3,0	1,5	14,5	2,0	27,0
1,0	3,0	1,5	10,5	2,0	28,0
1,0	2,8	1,5	13,0	2,0	27,0
1,0	2,7	1,5	15,0	2,0	16,0
1,0	2,6	1,5	14,5	2,0	20,0
1,0	2,5	1,5	11,5	2,0	32,0
1,0	2,8	1,5	11,5	2,0	24,0
1,0	2,7	1,5	11,0	2,5	22,0
1,0	2,3	1,5	13,0	2,5	20,0
1,0	3,3	1,5	11,0	2,5	24,0
1,0	2,9	1,5	8,5	2,5	19,0
1,0	2,8	1,5	15,0	2,5	16,0
1,0	2,6	1,5	13,0	2,5	27,0
1,0	2,5	1,5	13,0	2,5	24,0
1,0	2,5	1,5	12,5	2,5	26,0
1,0	2,8	1,5	16,5	2,5	19,0
1,0	2,9	1,5	10,5	2,5	32,5
1,0	3,3	1,5	12,5	2,5	26,0
1,0	2,6	1,5	13,5	2,5	31,0
1,0	2,8	1,5	15,0	2,5	20,0
1,0	2,1	1,5	14,0	3,0	25,0
1,0	2,9	1,5	16,5	3,0	30,0
1,0	3,0	1,5	14,0	3,0	31,0
1,0	2,7	1,5	14,0	3,0	33,0

1,0	2,1	2,0	16,0	3,0	32,0
1,0	2,9	2,0	14,0	3,0	33,0
1,0	2,6	2,0	14,5	3,0	26,5
1,0	2,4	2,0	14,5	3,0	25,0
1,0	3,1	2,0	16,0	3,0	28,0
1,0	2,3	2,0	15,0	3,0	26,0
1,0	3,1	2,0	13,0	3,0	27,0
1,0	2,9	2,0	11,0	3,0	26,0
1,0	2,8	2,0	13,5	3,0	29,0
1,0	1,9	2,0	13,5	3,0	32,0
1,0	2,1	2,0	16,0	3,0	19,0
1,0	2,6	2,0	15,5	3,0	24,0
1,0	2,8	2,0	14,0	3,0	31,0
1,0	2,6	2,0	13,0	3,0	32,0
1,0	3,6	2,0	15,0	3,5	31,0
1,5	3,8	2,0	15,0	3,5	31,0
1,5	2,5	2,0	14,0	3,5	24,0
1,5	2,6	2,0	17,0	3,5	27,0
1,5	3,1	2,0	16,0	3,5	31,0
1,5	2,9	2,0	15,5	4,0	24,0
1,5	3,3	2,0	16,0	4,0	32,0
1,5	3,0	2,0	14,0	-	-
1,5	3,0	2,5	19,0	-	-
1,5	2,3	2,5	17,0	-	-
1,5	3,3	2,5	16,0	-	-
1,5	2,1	2,5	16,5	-	-
1,5	3,0	3,0	17,0	-	-
1,5	2,3	3,0	19,5	-	-

1,0	2,4	2,0	16,0	3,0	28,5
1,0	2,2	2,0	16,5	3,0	16,5
1,0	2,2	2,0	14,0	3,0	27,5
1,0	2,3	2,0	15,0	3,0	26,5
1,0	2,0	2,0	13,0	3,0	25,0
1,0	3,0	2,0	16,5	3,0	24,0
1,0	2,6	2,0	15,5	3,0	24,0
1,0	2,6	2,0	16,0	3,0	32,0
1,0	2,8	2,0	16,5	3,0	21,0
1,0	2,8	2,0	15,0	3,0	32,0
1,0	2,6	2,0	16,0	3,0	26,5
1,0	2,9	2,0	15,5	3,0	26,0
1,0	3,0	2,0	14,5	3,0	26,0
1,0	2,4	2,0	14,5	3,0	19,0
1,0	1,8	2,0	13,0	3,5	27,5
1,0	2,7	2,0	13,5	3,5	25,0
1,0	2,9	2,0	15,5	3,5	24,0
1,0	2,7	2,0	13,0	3,5	27,5
1,0	3,1	2,0	13,5	3,5	31,0
1,0	2,4	2,0	14,0	3,5	28,0
1,0	2,0	2,0	16,0	3,5	23,0
1,0	2,6	2,0	17,0	4,0	25,0
1,0	3,0	2,0	16,0	4,0	34,0
1,5	2,8	2,0	16,5	4,0	21,5
1,5	2,9	2,0	15,0	4,0	21,5
1,5	2,6	2,0	14,0	4,0	33,0
1,5	2,9	2,0	14,5	4,0	27,5
1,5	3,0	2,0	17,5	-	-
1,5	3,1	2,0	15,5	-	-
1,5	3,5	2,0	17,0	-	-
1,5	2,9	2,0	16,0	-	-
1,5	3,2	2,5	20,5	-	-
1,5	2,7	2,5	18,0	-	-
1,5	2,2	2,5	16,5	-	-
1,5	2,4	15,0	15,5	-	-
1,5	2,0	-	-	-	-
1,5	3,2	-	-	-	-
1,5	3,7	-	-	-	-
1,5	2,9	-	-	-	-

<b>BANDEJA 15 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,4	1,0	12,5	1,5	13,0
0,5	3,3	1,0	8,5	1,5	16,0
0,5	2,8	1,0	8,9	1,5	19,5
0,5	2,8	1,5	13,0	2,0	21,5
0,5	2,8	1,5	12,5	2,0	22,0
0,5	2,9	1,5	17,5	2,0	20,0
0,5	2,6	1,5	13,0	2,0	26,0
0,5	2,9	1,5	13,0	2,0	26,5
0,5	3,6	1,5	13,5	2,0	18,5
0,5	2,9	1,5	15,5	2,0	22,5
0,5	3,2	1,5	15,5	2,0	19,0
1,0	3,1	1,5	12,0	2,0	26,0
1,0	2,8	1,5	13,0	2,0	20,5
1,0	2,9	1,5	10,5	2,0	26,0
1,0	2,7	1,5	12,5	2,0	22,5
1,0	2,9	1,5	12,5	2,0	27,0
1,0	3,1	2,0	16,0	2,0	19,0
1,0	2,2	2,0	13,5	2,0	16,0
1,0	3,9	2,0	18,0	2,0	19,0
1,0	2,7	2,0	14,0	2,0	23,0
1,0	2,9	2,0	14,5	2,0	15,0
1,0	2,9	2,0	14,5	2,0	22,5
1,0	3,0	2,0	15,0	2,0	25,0
1,0	3,0	2,0	14,5	2,0	23,0
1,0	2,7	2,0	16,5	2,0	26,5
1,0	2,4	2,0	13,5	2,0	24,0
1,0	2,6	2,0	15,0	2,5	23,0
1,0	2,8	2,0	15,0	2,5	23,5
1,0	3,0	2,0	15,0	2,5	22,0
1,0	2,7	2,0	16,5	2,5	24,0
1,0	2,4	2,0	15,0	2,5	22,0
1,0	2,8	2,0	7,5	2,5	23,0
1,0	2,3	2,0	15,0	2,5	19,5
1,0	2,7	2,0	14,5	2,5	22,5
1,0	2,7	2,0	16,0	2,5	20,0

<b>BANDEJA 16 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,4	0,5	11,0	1,5	20,0
0,5	2,9	0,5	9,5	1,5	27,0
0,5	2,6	1,0	10,0	2,0	19,5
0,5	2,8	1,5	12,0	2,0	16,0
0,5	2,9	1,5	12,0	2,0	26,0
1,0	3,0	1,5	13,0	2,0	25,0
1,0	2,8	1,5	12,0	2,0	24,0
1,0	2,6	1,5	10,5	2,0	20,0
1,0	2,7	1,5	15,5	2,0	24,0
1,0	2,6	1,5	13,0	2,0	25,0
1,0	3,1	1,5	12,0	2,0	23,0
1,0	2,2	1,5	9,0	2,0	27,0
1,0	3,6	1,5	13,0	2,0	21,0
1,0	3,2	1,5	11,0	2,0	21,5
1,0	3,0	1,5	12,0	2,0	25,0
1,0	3,0	1,5	16,0	2,0	30,5
1,0	2,8	1,5	13,5	2,0	23,0
1,0	3,8	1,5	11,5	2,0	27,0
1,0	2,9	1,5	15,5	2,0	27,0
1,0	2,8	2,0	16,0	2,5	26,0
1,0	3,1	2,0	13,0	2,5	28,0
1,0	3,1	2,0	19,0	2,5	26,0
1,0	2,9	2,0	14,0	2,5	21,0
1,0	2,9	2,0	16,0	2,5	24,0
1,0	2,7	2,0	14,0	2,5	27,0
1,0	2,8	2,0	16,5	2,5	25,0
1,0	2,7	2,0	13,5	2,5	26,0
1,0	2,5	2,0	13,5	2,5	26,0
1,0	2,6	2,0	13,0	2,5	28,0
1,0	3,1	2,0	16,0	2,5	23,0
1,0	3,0	2,0	12,5	2,5	29,0
1,0	2,2	2,0	15,0	2,5	26,5
1,0	2,9	2,0	15,5	2,5	21,0
1,0	2,6	2,0	15,5	2,5	24,0
1,0	2,9	2,0	14,0	2,5	16,0

1,0	2,6	2,0	18,0	2,5	25,5
1,0	2,9	2,0	16,0	2,5	18,0
1,0	2,9	2,0	12,0	2,5	23,0
1,0	2,6	2,0	13,5	2,5	27,0
1,0	2,1	2,0	16,5	2,5	24,0
1,0	2,5	2,0	14,5	3,0	21,0
1,0	2,6	2,0	12,0	3,0	28,0
1,0	3,7	2,0	12,0	3,0	22,5
1,0	2,8	2,0	15,0	3,0	26,5
1,0	2,9	2,0	17,0	3,0	24,5
1,0	3,3	2,0	15,5	3,0	22,5
1,0	2,9	2,0	16,0	3,0	24,5
1,0	2,8	2,0	14,5	3,0	24,0
1,0	3,0	2,0	14,0	3,5	29,0
1,0	2,5	2,0	15,5	3,5	26,0
1,0	2,7	2,0	12,0	3,5	29,0
1,0	2,8	2,0	16,5	3,5	23,5
1,0	2,8	2,0	14,0	4,0	21,0
1,5	4,0	2,0	13,5	4,0	24,5
1,5	2,9	2,0	14,5	4,0	21,0
1,5	2,7	2,5	16,0	4,0	29,0
1,5	2,8	2,5	16,5	-	-
1,5	3,1	2,5	16,5	-	-
1,5	2,3	2,5	14,5	-	-
1,5	2,5	2,5	13,0	-	-
1,5	2,8	2,5	16,0	-	-
1,5	3,0	2,5	16,5	-	-
1,5	2,6	2,5	17,5	-	-
1,5	2,8	2,5	18,0	-	-
1,5	3,5	2,5	15,0	-	-
1,5	2,9	2,5	18,0	-	-
1,5	3,0	2,5	18,0	-	-

1,0	3,1	2,0	14,5	2,5	25,0
1,0	2,5	2,0	16,5	2,5	23,0
1,0	2,8	2,0	16,0	3,0	31,5
1,0	2,3	2,0	13,0	3,0	28,5
1,0	2,7	2,0	12,0	3,0	22,0
1,0	2,9	2,0	13,0	3,0	25,0
1,0	2,6	2,0	16,0	3,0	26,0
1,0	2,9	2,0	14,5	3,0	27,5
1,0	3,4	2,0	16,5	3,0	22,0
1,0	3,0	2,0	13,0	3,0	31,5
1,0	2,9	2,0	14,5	3,0	30,0
1,0	2,7	2,0	16,5	3,0	30,0
1,0	2,9	2,0	17,0	3,0	21,0
1,5	3,2	2,0	17,5	3,0	30,5
1,5	3,1	2,0	16,0	3,0	24,0
1,5	2,6	2,5	16,5	3,5	27,0
1,5	4,0	2,5	18,0	3,5	21,0
1,5	2,5	2,5	15,5	3,5	21,0
1,5	2,6	2,5	17,0	3,5	28,0
1,5	3,4	2,5	16,0	3,5	18,0
1,5	3,0	2,5	17,0	3,5	32,0
1,5	2,7	2,5	16,5	4,0	27,5
1,5	3,0	2,5	12,5	4,0	26,5
1,5	3,4	2,5	16,0	-	-
1,5	4,1	2,5	16,0	-	-
1,5	3,0	2,5	16,5	-	-
1,5	3,1	2,5	19,5	-	-
1,5	3,2	2,5	18,5	-	-
1,5	3,0	2,5	19,0	-	-
1,5	3,4	3,0	18,0	-	-

<b>BANDEJA 17 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,3	1,5	15,5	2,0	28,0
0,5	2,5	1,5	12,5	2,0	30,0
0,5	2,6	1,5	15,5	2,0	35,0
0,5	3,7	1,5	14,5	2,0	33,0
0,5	2,4	1,5	12,5	2,0	28,0
0,5	2,5	1,5	12,0	2,0	20,0
0,5	2,2	1,5	14,5	2,0	26,0
0,5	3,1	1,5	15,0	2,0	28,0
0,5	3,2	1,5	15,0	2,0	32,0
0,5	2,3	1,5	16,0	2,5	32,5
0,5	2,9	1,5	14,0	2,5	32,0
0,5	2,9	1,5	13,0	2,5	27,5
0,5	2,3	1,5	12,0	2,5	27,5
1,0	3,0	1,5	16,5	2,5	33,0
1,0	2,8	1,5	12,0	2,5	28,0
1,0	2,9	1,5	14,0	2,5	19,0
1,0	3,2	2,0	17,0	2,5	31,0
1,0	3,2	2,0	14,5	2,5	38,0
1,0	2,3	2,0	15,0	2,5	27,0
1,0	3,1	2,0	17,0	2,5	32,0
1,0	2,8	2,0	16,5	2,5	34,0
1,0	2,9	2,0	18,5	2,5	30,0
1,0	2,4	2,0	16,0	2,5	31,0
1,0	2,9	2,0	16,0	3,0	21,0
1,0	2,6	2,0	17,0	3,0	27,0
1,0	3,0	2,0	17,5	3,0	26,0
1,0	3,0	2,0	16,0	3,0	30,5
1,0	2,8	2,0	16,5	3,0	27,0
1,0	3,0	2,0	13,0	3,0	27,5
1,0	2,8	2,0	15,0	3,0	29,0
1,0	2,5	2,0	17,5	3,0	34,0
1,0	2,9	2,0	18,0	3,0	31,0
1,0	3,7	2,0	17,5	3,0	29,0
1,0	2,8	2,0	18,0	3,0	30,0
1,0	2,9	2,0	16,5	3,0	32,0

<b>BANDEJA 18 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,0	1,0	17,0	1,5	24,0
0,5	3,2	1,0	12,0	2,0	30,0
0,5	2,1	1,0	11,0	2,0	27,0
0,5	2,8	1,0	11,5	2,0	32,0
1,0	2,9	1,0	13,0	2,0	31,0
1,0	2,7	1,0	10,0	2,0	32,5
1,0	3,0	1,0	12,0	2,0	25,0
1,0	3,2	1,5	15,0	2,0	29,5
1,0	2,2	1,5	13,0	2,5	29,5
1,0	2,9	1,5	13,0	2,5	26,5
1,0	2,2	1,5	14,0	2,5	29,0
1,0	2,4	1,5	13,5	2,5	32,5
1,0	2,8	1,5	15,0	2,5	26,0
1,0	2,9	1,5	12,5	2,5	33,0
1,0	2,8	1,5	14,5	2,5	29,0
1,0	3,0	1,5	16,0	2,5	29,5
1,0	2,8	1,5	13,0	2,5	39,0
1,0	2,5	1,5	15,0	3,0	28,0
1,0	2,8	1,5	14,5	3,0	24,0
1,0	3,0	1,5	15,0	3,0	29,0
1,0	2,6	1,5	13,5	3,0	27,5
1,0	2,3	1,5	13,0	3,0	29,5
1,0	2,3	1,5	14,0	3,0	25,0
1,0	3,0	1,5	8,0	3,0	26,5
1,0	2,5	1,5	11,0	3,0	30,0
1,0	2,5	1,5	12,5	3,0	29,5
1,0	3,1	1,5	12,0	3,0	31,0
1,0	2,8	1,5	15,0	3,0	27,0
1,0	2,5	1,5	14,5	3,0	28,0
1,0	3,1	1,5	13,5	3,0	33,0
1,0	3,1	2,0	18,5	3,0	33,0
1,0	2,8	2,0	14,0	3,0	25,0
1,0	2,6	2,0	13,0	3,0	26,0
1,0	2,9	2,0	17,0	3,0	28,0
1,0	2,5	2,0	17,0	3,0	31,0



1,0	2,8	2,0	17,0	3,0	30,5
1,0	2,9	2,0	16,0	3,0	32,0
1,0	2,6	2,0	18,0	3,5	32,0
1,0	2,6	2,0	15,5	3,5	27,5
1,0	3,3	2,0	16,5	3,5	26,0
1,0	2,9	2,0	15,5	3,5	26,0
1,0	1,9	2,0	17,0	3,5	32,0
1,0	2,3	2,0	16,0	3,5	31,0
1,0	3,0	2,0	15,5	3,5	30,0
1,0	2,8	2,0	17,5	3,5	28,5
1,0	3,1	2,0	20,0	4,0	40,0
1,0	2,6	2,0	16,5	4,0	32,5
1,0	2,8	2,0	14,0	4,0	33,0
1,0	2,7	2,0	14,5	4,0	32,5
1,0	2,7	2,0	15,0	4,0	31,0
1,0	3,0	2,0	14,0	4,0	30,0
1,0	3,0	2,0	17,0	4,0	33,0
1,0	2,7	2,0	14,0	4,0	23,0
1,0	2,9	2,0	19,0	4,0	31,5
1,0	2,9	2,5	18,0	4,5	28,0
1,0	2,6	2,5	18,0	-	-
1,0	2,8	2,5	18,0	-	-
1,5	3,1	2,5	16,0	-	-
1,5	3,8	2,5	18,0	-	-
1,5	3,0	2,5	19,5	-	-
1,5	3,1	3,0	21,5	-	-
1,5	3,3	3,0	17,0	-	-
1,5	3,2	-	-	-	-
1,5	3,9	-	-	-	-
1,5	3,3	-	-	-	-
1,5	2,8	-	-	-	-
1,5	2,1	-	-	-	-
1,5	3,0	-	-	-	-
1,5	3,0	-	-	-	-
1,5	3,1	-	-	-	-

1,0	3,0	2,0	13,0	3,5	33,5
1,0	2,7	2,0	17,0	3,5	31,0
1,0	3,0	2,0	16,0	3,5	27,0
1,0	2,7	2,0	16,5	3,5	29,0
1,0	2,7	2,0	15,5	3,5	28,0
1,0	3,2	2,0	16,5	3,5	30,0
1,0	2,8	2,0	15,0	3,5	28,0
1,0	2,6	2,0	16,0	3,5	26,5
1,0	2,8	2,0	15,0	3,5	35,0
1,0	2,8	2,0	16,0	3,5	28,5
1,5	2,5	2,0	13,0	4,0	29,5
1,5	3,4	2,0	15,5	4,0	28,0
1,5	3,0	2,0	15,0	4,0	31,5
1,5	3,6	2,0	13,5	4,0	34,0
1,5	3,3	2,0	17,5	4,5	24,0
1,5	2,8	2,0	16,5	-	-
1,5	3,5	2,0	16,5	-	-
1,5	3,1	2,0	19,0	-	-
1,5	2,9	2,5	15,5	-	-
1,5	3,2	2,5	17,0	-	-
1,5	3,0	2,5	18,0	-	-
1,5	3,1	2,5	18,0	-	-
1,5	3,5	3,0	20,5	-	-
1,5	3,1	-	-	-	-
1,5	3,1	-	-	-	-
1,5	3,0	-	-	-	-
1,5	2,6	-	-	-	-

<b>BANDEJA 19 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	2,4	1,0	9,5	1,5	25,5
0,5	2,1	1,0	11,0	2,0	22,0
0,5	2,8	1,0	14,0	2,0	26,0
0,5	2,9	1,0	12,0	2,0	17,5
0,5	2,6	1,0	13,0	2,5	21,5
1,0	2,6	1,0	13,0	2,5	18,0
1,0	3,0	1,5	12,0	2,5	28,0
1,0	2,8	1,5	11,0	2,5	22,0
1,0	2,8	1,5	12,0	2,5	26,0
1,0	2,9	1,5	13,5	2,5	26,0
1,0	2,6	1,5	13,5	2,5	20,5
1,0	2,6	1,5	11,0	2,5	20,0
1,0	2,8	1,5	12,0	2,5	25,0
1,0	2,7	1,5	11,0	2,5	26,0
1,0	2,6	1,5	10,5	2,5	20,0
1,0	2,5	1,5	12,0	2,5	28,0
1,0	2,5	1,5	13,0	3,0	28,0
1,0	2,2	1,5	12,0	3,0	28,5
1,0	2,8	1,5	11,0	3,0	16,5
1,0	2,6	1,5	11,0	3,0	24,0
1,0	2,2	1,5	11,0	3,0	27,5
1,0	2,5	1,5	13,0	3,0	26,5
1,0	2,6	1,5	14,0	3,0	19,0
1,0	2,5	1,5	13,0	3,0	28,0
1,0	2,6	1,5	13,0	3,0	27,5
1,0	2,7	1,5	14,0	3,0	26,5
1,0	3,0	1,5	13,0	3,0	25,5
1,0	2,8	2,0	14,0	3,0	24,0
1,0	2,6	2,0	14,0	3,0	21,5
1,0	3,0	2,0	13,0	3,0	29,5
1,0	2,4	2,0	12,0	3,0	25,0
1,0	2,8	2,0	16,5	3,0	25,0
1,0	2,4	2,0	13,0	3,5	25,5
1,0	2,9	2,0	13,0	3,5	25,0
1,0	2,8	2,0	16,0	3,5	29,5

<b>BANDEJA 20 (CON Trichoderma)</b>					
Tiempo 1		Tiempo 2		Tiempo 3	
DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)	DAC (mm)	H (cm)
0,5	4,2	1,0	12,0	1,5	15,0
0,5	2,5	1,0	11,5	2,0	24,5
0,5	2,9	1,5	15,5	2,0	20,0
0,5	2,7	1,5	14,0	2,0	24,5
0,5	2,6	1,5	12,0	2,0	29,0
0,5	3,0	1,5	15,0	2,0	22,0
0,5	2,8	1,5	14,0	2,0	26,5
1,0	3,7	1,5	12,0	2,0	21,0
1,0	3,5	1,5	13,0	2,0	26,5
1,0	2,8	1,5	11,0	2,0	28,0
1,0	3,0	1,5	13,5	2,0	23,0
1,0	2,8	1,5	10,5	2,0	20,0
1,0	3,2	1,5	10,5	2,0	24,5
1,0	2,9	1,5	11,0	2,0	20,0
1,0	2,7	1,5	14,0	2,5	29,0
1,0	3,5	1,5	13,5	2,5	32,0
1,0	3,3	1,5	11,5	2,5	29,0
1,0	2,6	2,0	15,5	2,5	28,0
1,0	3,3	2,0	13,5	2,5	24,0
1,0	2,2	2,0	16,0	2,5	19,5
1,0	2,6	2,0	14,5	2,5	23,0
1,0	3,1	2,0	13,0	2,5	28,0
1,0	2,7	2,0	15,0	2,5	25,5
1,0	3,3	2,0	15,0	2,5	27,0
1,0	2,8	2,0	14,0	2,5	27,0
1,0	3,0	2,0	15,0	2,5	30,5
1,0	2,9	2,0	13,0	2,5	21,0
1,0	2,4	2,0	14,0	2,5	22,5
1,0	2,1	2,0	15,0	2,5	13,0
1,0	2,4	2,0	12,0	2,5	26,0
1,0	2,4	2,0	14,5	2,5	26,0
1,0	3,0	2,0	15,5	2,5	24,0
1,0	3,4	2,0	13,5	2,5	29,5
1,0	2,7	2,0	17,5	2,5	22,0
1,0	3,4	2,0	14,0	2,5	24,0

1,0	3,5	2,0	14,5	3,5	25,0
1,0	2,6	2,0	13,5	3,5	27,0
1,0	2,4	2,0	14,5	3,5	27,0
1,0	2,5	2,0	14,0	3,5	25,5
1,0	2,8	2,0	15,0	3,5	28,0
1,0	2,7	2,0	17,0	3,5	30,5
1,0	2,2	2,0	12,0	3,5	28,5
1,0	3,0	2,0	13,0	4,0	27,5
1,0	2,1	2,0	15,0	4,0	28,0
1,0	2,8	2,0	15,0	4,0	24,0
1,0	3,4	2,0	13,0	4,0	25,0
1,0	2,9	2,0	13,5	4,0	29,0
1,0	3,2	2,0	14,0	4,0	25,5
1,5	2,8	2,0	16,0	4,0	29,0
1,5	3,2	2,0	14,5	-	-
1,5	3,2	2,0	14,0	-	-
1,5	2,5	2,0	13,5	-	-
1,5	3,1	2,0	12,0	-	-
1,5	2,7	2,0	17,5	-	-
1,5	3,5	2,0	13,0	-	-
1,5	3,1	2,5	14,5	-	-
1,5	2,8	2,5	17,0	-	-
1,5	2,6	3,0	17,0	-	-
1,5	2,0	-	-	-	-
1,5	2,8	-	-	-	-
1,5	3,6	-	-	-	-
1,5	3,5	-	-	-	-
1,5	2,7	-	-	-	-
1,5	2,6	-	-	-	-
1,5	2,5	-	-	-	-

1,0	2,4	2,0	14,5	2,5	22,0
1,0	2,0	2,0	15,0	2,5	20,0
1,0	3,6	2,0	15,0	2,5	23,0
1,0	2,5	2,0	13,5	2,5	29,5
1,0	3,0	2,0	13,0	2,5	27,0
1,0	2,8	2,0	13,0	2,5	27,5
1,0	2,8	2,0	15,0	2,5	25,0
1,0	2,3	2,0	14,5	3,0	24,5
1,0	2,6	2,0	13,0	3,0	26,0
1,0	3,1	2,0	14,0	3,0	28,0
1,0	3,2	2,0	15,0	3,0	27,0
1,0	3,0	2,0	14,0	3,0	25,5
1,0	2,5	2,0	14,5	3,0	25,0
1,0	2,5	2,0	13,0	3,0	25,0
1,0	3,2	2,0	14,5	3,0	27,0
1,0	2,4	2,0	17,0	3,0	25,0
1,0	2,8	2,0	14,5	3,0	28,0
1,0	3,5	2,0	14,0	3,0	24,0
1,0	3,9	2,0	14,0	3,0	29,5
1,5	3,3	2,0	19,5	3,5	23,5
1,5	2,6	2,0	14,0	3,5	30,0
1,5	2,8	2,0	14,5	3,5	23,0
1,5	2,8	2,0	15,0	3,5	27,5
1,5	2,7	2,0	15,0	4,0	26,0
1,5	2,5	2,0	14,0	-	-
1,5	2,8	2,5	17,0	-	-
1,5	2,2	2,5	16,0	-	-
1,5	2,4	2,5	15,0	-	-
1,5	2,8	2,5	17,5	-	-
1,5	2,6	2,5	17,0	-	-
1,5	3,9	2,5	16,0	-	-
1,5	2,6	-	-	-	-

### 9.1.2 Peso Fresco y Seco

TIEMPO 2													
SIN <i>Trichoderma</i>							CON <i>Trichoderma</i>						
No. plantín	PESO FRESCO (g)			PESO SECO (g)			No. plantín	PESO FRESCO (g)			PESO SECO (g)		
	parte aérea	raíz	TOTAL	parte aérea	raíz	TOTAL		parte aérea	raíz	TOTAL	parte aérea	raíz	TOTAL
1	2,06	0,96	<b>3,02</b>	0,48	0,16	<b>0,64</b>	1	1,76	0,78	<b>2,54</b>	0,44	0,12	<b>0,56</b>
2	1,26	0,70	<b>1,96</b>	0,28	0,10	<b>0,38</b>	2	0,92	0,48	<b>1,40</b>	0,24	0,08	<b>0,32</b>
3	2,12	1,44	<b>3,56</b>	0,54	0,24	<b>0,78</b>	3	0,76	0,48	<b>1,24</b>	0,42	0,06	<b>0,48</b>
4	1,14	0,54	<b>1,68</b>	0,28	0,06	<b>0,34</b>	4	1,64	1,08	<b>2,72</b>	0,36	0,14	<b>0,50</b>
5	1,56	0,40	<b>1,96</b>	0,42	0,08	<b>0,50</b>	5	1,64	0,72	<b>2,36</b>	0,42	0,14	<b>0,56</b>
6	1,54	0,86	<b>2,40</b>	0,36	0,14	<b>0,50</b>	6	2,50	1,18	<b>3,68</b>	0,58	0,18	<b>0,76</b>
7	1,14	0,54	<b>1,68</b>	0,28	0,10	<b>0,38</b>	7	1,92	0,90	<b>2,82</b>	0,18	0,14	<b>0,32</b>
8	0,86	0,52	<b>1,38</b>	0,20	0,06	<b>0,26</b>	8	1,68	0,94	<b>2,62</b>	0,42	0,14	<b>0,56</b>
9	1,76	0,82	<b>2,58</b>	0,40	0,12	<b>0,52</b>	9	1,08	0,52	<b>1,60</b>	0,26	0,08	<b>0,34</b>
10	2,18	0,90	<b>3,08</b>	0,64	0,16	<b>0,80</b>	10	1,78	1,32	<b>3,10</b>	0,44	0,18	<b>0,62</b>
11	1,86	0,80	<b>2,66</b>	0,48	0,14	<b>0,62</b>	11	2,30	1,14	<b>3,44</b>	0,64	0,20	<b>0,84</b>
12	1,13	0,48	<b>1,61</b>	0,28	0,10	<b>0,38</b>	12	1,64	0,74	<b>2,38</b>	0,62	0,14	<b>0,76</b>
13	1,74	0,82	<b>2,56</b>	0,48	0,16	<b>0,64</b>	13	2,4	1,08	<b>3,48</b>	0,84	0,16	<b>1,00</b>
14	1,60	0,48	<b>2,08</b>	0,36	0,08	<b>0,44</b>	14	1,74	1,88	<b>3,62</b>	0,48	0,16	<b>0,64</b>
15	2,00	0,84	<b>2,84</b>	0,50	0,14	<b>0,64</b>	15	1,42	1,00	<b>2,42</b>	0,38	0,16	<b>0,54</b>
16	1,16	0,56	<b>1,72</b>	0,30	0,10	<b>0,40</b>	16	1,64	1,08	<b>2,72</b>	0,38	0,14	<b>0,52</b>
17	1,76	0,96	<b>2,72</b>	0,48	0,16	<b>0,64</b>	17	2,18	1,08	<b>3,26</b>	0,52	0,14	<b>0,66</b>
18	1,20	0,58	<b>1,78</b>	0,32	0,12	<b>0,44</b>	18	1,20	0,52	<b>1,72</b>	0,28	0,04	<b>0,32</b>
19	1,66	0,68	<b>2,34</b>	0,42	0,12	<b>0,54</b>	19	0,90	0,44	<b>1,34</b>	0,18	0,04	<b>0,22</b>
20	1,96	0,62	<b>2,58</b>	0,44	0,10	<b>0,54</b>	20	1,36	0,48	<b>1,84</b>	0,34	0,10	<b>0,44</b>
21	1,84	1,08	<b>2,92</b>	0,50	0,22	<b>0,72</b>	21	1,08	0,46	<b>1,54</b>	0,24	0,08	<b>0,32</b>
22	0,68	0,38	<b>1,06</b>	0,18	0,06	<b>0,24</b>	22	0,52	0,36	<b>0,88</b>	0,14	0,06	<b>0,20</b>
23	2,22	1,02	<b>3,24</b>	0,56	0,18	<b>0,74</b>	23	1,24	0,68	<b>1,92</b>	0,28	0,10	<b>0,38</b>
24	1,16	0,48	<b>1,64</b>	0,32	0,10	<b>0,42</b>	24	1,48	0,56	<b>2,04</b>	0,34	0,08	<b>0,42</b>
25	1,12	0,66	<b>1,78</b>	0,32	0,12	<b>0,44</b>	25	1,22	0,58	<b>1,80</b>	0,28	0,10	<b>0,38</b>
26	1,30	0,58	<b>1,88</b>	0,26	0,08	<b>0,34</b>	26	1,30	0,54	<b>1,84</b>	0,34	0,08	<b>0,42</b>
27	1,80	0,76	<b>2,56</b>	0,50	0,14	<b>0,64</b>	27	1,42	0,62	<b>2,04</b>	0,38	0,10	<b>0,48</b>
28	1,04	0,36	<b>1,40</b>	0,24	0,08	<b>0,32</b>	28	2,04	0,96	<b>3,00</b>	0,48	0,12	<b>0,60</b>
29	0,70	0,40	<b>1,10</b>	0,18	0,06	<b>0,24</b>	29	1,44	0,50	<b>1,94</b>	0,33	0,10	<b>0,43</b>
30	0,50	0,26	<b>0,76</b>	0,14	0,04	<b>0,18</b>	30	1,22	0,44	<b>1,66</b>	0,36	0,10	<b>0,46</b>
31	1,04	0,48	<b>1,52</b>	0,28	0,08	<b>0,36</b>	31	2,08	0,92	<b>3,00</b>	0,56	0,14	<b>0,70</b>
32	0,42	0,04	<b>0,46</b>	0,10	0,02	<b>0,12</b>	32	1,36	0,58	<b>1,94</b>	0,50	0,10	<b>0,60</b>
33	1,98	0,96	<b>2,94</b>	0,34	0,20	<b>0,54</b>	33	1,76	0,86	<b>2,62</b>	0,56	0,12	<b>0,68</b>

34	1,22	0,68	<b>1,90</b>	0,34	0,12	<b>0,46</b>	34	2,52	1,40	<b>3,92</b>	0,82	0,24	<b>1,06</b>
35	1,44	0,78	<b>2,22</b>	0,34	0,12	<b>0,46</b>	35	1,3	0,72	<b>2,02</b>	0,34	0,10	<b>0,44</b>
36	2,40	1,28	<b>3,68</b>	0,76	0,24	<b>1,00</b>	36	1,84	0,80	<b>2,64</b>	0,48	0,12	<b>0,60</b>
37	0,32	0,20	<b>0,52</b>	0,12	0,02	<b>0,14</b>	37	1,30	0,66	<b>1,96</b>	0,30	0,10	<b>0,40</b>
38	0,84	0,48	<b>1,32</b>	0,74	0,10	<b>0,84</b>	38	1,40	0,92	<b>2,32</b>	0,40	0,18	<b>0,58</b>
39	1,02	0,40	<b>1,42</b>	0,26	0,06	<b>0,32</b>	39	2,10	1,28	<b>3,38</b>	0,52	0,20	<b>0,72</b>
40	1,46	0,68	<b>2,14</b>	0,42	0,12	<b>0,54</b>	40	2,60	1,18	<b>3,78</b>	0,68	0,16	<b>0,84</b>
41	1,70	0,74	<b>2,44</b>	0,38	0,10	<b>0,48</b>	41	1,44	0,80	<b>2,24</b>	0,34	0,10	<b>0,44</b>
42	1,54	0,90	<b>2,44</b>	0,38	0,16	<b>0,54</b>	42	1,70	0,48	<b>2,18</b>	0,44	0,12	<b>0,56</b>
43	1,00	0,28	<b>1,28</b>	0,22	0,06	<b>0,28</b>	43	1,34	0,66	<b>2,00</b>	0,48	0,12	<b>0,60</b>
44	1,62	0,54	<b>2,16</b>	0,44	0,12	<b>0,56</b>	44	1,22	0,74	<b>1,96</b>	0,64	0,10	<b>0,74</b>
45	1,26	0,46	<b>1,72</b>	0,34	0,08	<b>0,42</b>	45	1,52	0,72	<b>2,24</b>	0,78	0,14	<b>0,92</b>
							46	1,34	0,88	<b>2,22</b>	0,40	0,16	<b>0,56</b>
							47	2,04	1,12	<b>3,16</b>	0,72	0,22	<b>0,94</b>
							48	0,86	0,46	<b>1,32</b>	0,28	0,10	<b>0,38</b>
							49	1,74	1,34	<b>3,08</b>	0,40	0,20	<b>0,60</b>
							50	1,22	0,46	<b>1,68</b>	0,26	0,06	<b>0,32</b>

TIEMPO 3													
SIN <i>Trichoderma</i>							CON <i>Trichoderma</i>						
No. plantín	PESO FRESCO (g)			PESO SECO (g)			No. plantín	PESO FRESCO (g)			PESO SECO (g)		
	parte aérea	raíz	TOTAL	parte aérea	raíz	TOTAL		parte aérea	raíz	TOTAL	parte aérea	raíz	TOTAL
1	3,64	1,52	<b>5,16</b>	0,80	0,26	1,06	1	1,92	1,16	<b>3,08</b>	0,40	0,16	<b>0,56</b>
2	4,96	2,80	<b>7,76</b>	1,08	0,38	1,46	2	1,74	1,02	<b>2,76</b>	0,44	0,18	<b>0,62</b>
3	2,14	1,30	<b>3,44</b>	0,48	0,18	0,66	3	5,24	2,94	<b>8,18</b>	1,06	0,42	<b>1,48</b>
4	1,60	0,90	<b>2,50</b>	0,30	0,10	0,40	4	3,08	1,96	<b>5,04</b>	0,72	0,30	<b>1,02</b>
5	3,22	0,94	<b>4,16</b>	0,66	0,16	0,82	5	1,34	0,58	<b>1,92</b>	0,30	0,10	<b>0,40</b>
6	2,10	1,22	<b>3,32</b>	0,46	0,16	0,62	6	2,66	1,52	<b>4,18</b>	0,60	0,24	<b>0,84</b>
7	2,68	1,30	<b>3,98</b>	0,60	0,20	0,80	7	1,26	0,70	<b>1,96</b>	0,30	0,12	<b>0,42</b>
8	3,04	1,60	<b>4,64</b>	0,68	0,28	0,96	8	1,12	0,70	<b>1,82</b>	0,24	0,14	<b>0,38</b>
9	5,52	1,38	<b>6,90</b>	1,16	0,24	1,40	9	3,32	1,68	<b>5,00</b>	0,64	0,22	<b>0,86</b>
10	4,14	2,04	<b>6,18</b>	0,84	0,28	1,12	10	2,28	1,62	<b>3,90</b>	0,52	0,26	<b>0,78</b>
11	5,74	2,66	<b>8,40</b>	1,26	0,40	1,66	11	3,86	1,92	<b>5,78</b>	0,96	0,32	<b>1,28</b>
12	2,94	1,30	<b>4,24</b>	0,58	0,18	0,76	12	4,20	1,58	<b>5,78</b>	0,86	0,24	<b>1,10</b>
13	4,62	2,00	<b>6,62</b>	0,92	0,30	1,22	13	2,26	0,86	<b>3,12</b>	0,50	0,14	<b>0,64</b>
14	1,84	0,86	<b>2,70</b>	0,34	0,12	0,46	14	3,12	1,52	<b>4,64</b>	0,72	0,26	<b>0,98</b>
15	1,16	0,50	<b>1,66</b>	0,24	0,06	0,30	15	1,74	1,22	<b>2,96</b>	0,40	0,18	<b>0,58</b>
16	2,60	1,40	<b>4,00</b>	0,62	0,26	0,88	16	2,16	0,94	<b>3,10</b>	0,44	0,16	<b>0,60</b>
17	2,32	1,28	<b>3,60</b>	0,42	0,14	0,56	17	1,06	0,88	<b>1,94</b>	0,20	0,14	<b>0,34</b>
18	3,96	2,18	<b>6,14</b>	0,86	0,32	1,18	18	2,92	1,32	<b>4,24</b>	0,60	0,20	<b>0,80</b>
19	4,48	1,34	<b>5,82</b>	0,86	0,20	1,06	19	2,16	1,24	<b>3,40</b>	0,48	0,18	<b>0,66</b>
20	4,80	2,14	<b>6,94</b>	1,00	0,32	1,32	20	4,08	2,16	<b>6,24</b>	0,86	0,34	<b>1,20</b>
21	6,50	1,96	<b>8,46</b>	1,42	0,34	1,76	21	3,36	1,28	<b>4,64</b>	0,72	0,22	<b>0,94</b>
22	1,96	1,14	<b>3,10</b>	0,42	0,14	0,56	22	3,14	1,36	<b>4,50</b>	0,58	0,12	<b>0,70</b>
23	3,76	1,18	<b>4,94</b>	0,86	0,26	1,12	23	3,74	1,68	<b>5,42</b>	0,72	0,18	<b>0,90</b>
24	4,80	1,86	<b>6,66</b>	0,88	0,24	1,12	24	1,38	0,36	<b>1,74</b>	0,28	0,06	<b>0,34</b>
25	6,16	2,82	<b>8,98</b>	1,12	0,36	1,48	25	3,36	2,54	<b>5,90</b>	0,76	0,36	<b>1,12</b>
26	4,14	2,22	<b>6,36</b>	0,86	0,34	1,20	26	1,48	0,74	<b>2,22</b>	0,36	0,12	<b>0,48</b>
27	5,06	1,12	<b>6,18</b>	0,92	0,28	1,20	27	3,14	2,00	<b>5,14</b>	0,68	0,30	<b>0,98</b>
28	0,68	0,36	<b>1,04</b>	0,14	0,04	0,18	28	3,48	1,66	<b>5,14</b>	0,84	0,28	<b>1,12</b>
29	2,22	1,26	<b>3,48</b>	0,46	0,18	0,64	29	3,12	1,60	<b>4,72</b>	0,78	0,30	<b>1,08</b>
30	3,20	1,52	<b>4,72</b>	0,66	0,20	0,86	30	3,76	1,88	<b>5,64</b>	0,86	0,30	<b>1,16</b>
31	4,00	1,84	<b>5,84</b>	0,90	0,28	1,18	31	2,62	1,18	<b>3,80</b>	0,52	0,16	<b>0,68</b>
32	6,48	3,24	<b>9,72</b>	1,48	0,50	1,98	32	4,08	1,88	<b>5,96</b>	0,82	0,28	<b>1,10</b>
33	6,00	2,16	<b>8,16</b>	1,30	0,38	1,68	33	4,16	2,98	<b>7,14</b>	0,92	0,40	<b>1,32</b>
34	5,22	3,96	<b>9,18</b>	1,16	0,60	1,76	34	2,00	1,82	<b>3,82</b>	0,44	0,22	<b>0,66</b>
35	4,90	2,92	<b>7,82</b>	1,10	0,48	1,58	35	2,62	1,10	<b>3,72</b>	0,58	0,14	<b>0,72</b>
36	5,06	2,86	<b>7,92</b>	1,14	0,44	1,58	36	0,52	0,34	<b>0,86</b>	0,14	0,08	<b>0,22</b>
37	4,08	1,80	<b>5,88</b>	0,96	0,28	1,24	37	3,46	3,14	<b>6,60</b>	0,80	0,40	<b>1,20</b>
38	1,72	1,30	<b>3,02</b>	0,36	0,18	0,54	38	0,88	0,56	<b>1,44</b>	0,20	0,08	<b>0,28</b>

39	3,42	1,76	<b>5,18</b>	0,70	0,22	0,92	39	2,26	1,76	<b>4,02</b>	0,52	0,28	<b>0,80</b>
40	1,70	0,82	<b>2,52</b>	0,36	0,08	0,44	40	2,36	1,56	<b>3,92</b>	0,52	0,20	<b>0,72</b>
41	3,30	1,88	<b>5,18</b>	0,66	0,34	1,00	41	2,88	3,28	<b>6,16</b>	0,58	0,28	<b>0,86</b>
42	3,08	1,28	<b>4,36</b>	0,56	0,18	0,74	42	3,12	1,48	<b>4,60</b>	0,66	0,18	<b>0,84</b>
43	3,16	1,56	<b>4,72</b>	0,64	0,20	0,84	43	2,58	1,78	<b>4,36</b>	0,50	0,20	<b>0,70</b>
44	1,50	0,98	<b>2,48</b>	0,34	0,12	0,46	44	1,12	0,46	<b>1,58</b>	0,22	0,08	<b>0,30</b>
45	3,96	2,84	<b>6,80</b>	0,76	0,38	1,14	45	2,34	1,98	<b>4,32</b>	0,46	0,28	<b>0,74</b>
							46	3,06	2,24	<b>5,30</b>	0,72	0,30	<b>1,02</b>
							47	3,74	1,16	<b>4,90</b>	0,82	0,20	<b>1,02</b>
							48	3,38	3,06	<b>6,44</b>	0,92	0,42	<b>1,34</b>
							49	2,70	1,88	<b>4,58</b>	0,60	0,22	<b>0,82</b>
							50	2,40	2,78	<b>5,18</b>	0,52	0,36	<b>0,88</b>
							51	2,66	1,32	<b>3,98</b>	0,56	0,18	<b>0,74</b>
							52	2,64	1,98	<b>4,62</b>	0,58	0,24	<b>0,82</b>
							53	2,84	1,24	<b>4,08</b>	0,60	0,14	<b>0,74</b>
							54	1,74	1,58	<b>3,32</b>	0,44	0,20	<b>0,64</b>

## 9.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

**Cuadro A:** Análisis de la varianza DAC

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
DAC	3644	0,76	0,63	26,77

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1611,08	1299	1,24	5,84	<0,0001
Tratamiento	54,10	1	54,10	209,96	<0,0001
Tratamiento>Plantín	333,40	1294	0,26	1,21	<0,0001
Tiempo	1187,30	2	593,65	2796,54	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	36,28	2	18,14	85,45	<0,0001
Error	497,59	2344	0,21		
Total	2108,67	3643			

**Cuadro B:** Análisis de la varianza y medidas resumen DAC por tiempo

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
1	DAC	1295	0,02	0,02	25,15

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,37	1	1,37	20,81	<0,0001
Tratamiento	1,37	1	1,37	20,81	<0,0001
Error	84,92	1293	0,07		
Total	86,29	1294			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
2	DAC	1259	0,02	0,02	30,59

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8,53	1	8,53	27,64	<0,0001
Tratamiento	8,53	1	8,53	27,64	<0,0001
Error	388,08	1257	0,31		
Total	396,62	1258			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
3	DAC	1090	0,20	0,20	22,27

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	82,87	1	82,87	279,54	<0,0001
Tratamiento	82,87	1	82,87	279,54	<0,0001
Error	322,53	1088	0,30		
Total	405,39	1089			

Tiempo	Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
1	0	DAC	636	0,99	0,23	0,50	1,50
1	1	DAC	659	1,05	0,28	0,50	1,50
2	0	DAC	625	1,73	0,43	0,50	3,00
2	1	DAC	634	1,90	0,66	0,50	15,00
3	0	DAC	536	2,16	0,43	1,00	3,50
3	1	DAC	554	2,72	0,64	1,50	4,50



**Cuadro C: Análisis de la varianza H**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura	3644	0,93	0,89	22,65

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	262929,11	1299	202,41	23,63	<0,0001
Tratamiento	1575,88	1	1575,88	96,29	<0,0001
Tratamiento>Plantín	21177,51	1294	16,37	1,91	<0,0001
Tiempo	237357,99	2	118679,00	13853,33	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	2817,71	2	1408,86	164,46	<0,0001
Error	20080,63	2344	8,57		
Total	283009,73	3643			

**Cuadro D: Análisis de la varianza y medidas resumen H por tiempo**

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
1	Altura	1295	0,03	0,03	14,76

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,68	1	5,68	35,25	<0,0001
Tratamiento	5,68	1	5,68	35,25	<0,0001
Error	208,33	1293	0,16		
Total	214,01	1294			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
2	Altura	1259	1,2E-03	3,6E-04	18,25

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10,48	1	10,48	1,45	0,2287
Tratamiento	10,48	1	10,48	1,45	0,2287
Error	9079,75	1257	7,22		
Total	9090,23	1258			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
3	Altura	1090	0,18	0,18	18,91

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4577,06	1	4577,06	243,01	<0,0001
Tratamiento	4577,06	1	4577,06	243,01	<0,0001
Error	20492,03	1088	18,83		
Total	25069,09	1089			

Tiempo	Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
1	0	Altura	636	2,65	0,41	1,40	4,30
1	1	Altura	659	2,78	0,39	1,80	4,20
2	0	Altura	625	14,64	2,82	4,00	22,00
2	1	Altura	634	14,82	2,56	6,00	22,50
3	0	Altura	536	20,87	3,93	10,00	32,00
3	1	Altura	554	24,97	4,71	13,00	40,00

**Cuadro E:** Análisis de la varianza y medidas resumen PF total

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PF total	194	0,66	0,25	43,18

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16,44	105	0,16	1,63	0,0096
Tratamiento	0,71	1	0,71	8,33	0,0047
Tratamiento>Plantín	8,73	102	0,09	0,89	0,7161
Tiempo	6,71	1	6,71	69,72	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,29	1	0,29	2,98	0,0876
Error	8,47	88	0,10		
Total	24,91	193			

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	PF total	99	0,66	0,30	0,12	1,48
1	PF total	95	0,78	0,41	0,18	1,98

**Cuadro F:** Análisis de la varianza PFt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFt	194	0,72	0,40	43,61

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	235,11	105	2,24	2,20	0,0001
Tratamiento	9,97	1	9,97	10,60	0,0015
Tratamiento>Plantín	95,93	102	0,94	0,92	0,6469
Tiempo	121,41	1	121,41	119,39	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	7,81	1	7,81	7,68	0,0068
Error	89,49	88	1,02		
Total	324,60	193			

**Cuadro G:** Análisis de la varianza y medidas resumen PFt por tiempo

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
1	PFt	95	0,03	0,01	32,55

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,57	1	0,57	2,43	0,1227
Tratamiento	0,57	1	0,57	2,43	0,1227
Error	21,84	93	0,23		
Total	22,41	94			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
2	PFt	99	0,13	0,12	40,41

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	23,32	1	23,32	14,83	0,0002
Tratamiento	23,32	1	23,32	14,83	0,0002
Error	152,51	97	1,57		
Total	175,83	98			

Tratamiento	Tiempo	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	1	PFt	45	1,41	0,50	0,32	2,40
0	2	PFt	50	2,66	0,99	0,52	5,24
1	1	PFt	54	1,56	0,47	0,52	2,60
1	2	PFt	45	3,63	1,51	0,68	6,50

**Cuadro H:** Análisis de la varianza y medidas resumen PFr

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFr	194	0,72	0,39	47,51

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	73,59	105	0,70	2,16	0,0001
Tratamiento	0,34	1	0,34	0,90	0,3448
Tratamiento>Plantín	38,04	102	0,37	1,15	0,2488
Tiempo	35,18	1	35,18	108,67	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,03	1	0,03	0,11	0,7441
Error	28,49	88	0,32		
Total	102,08	193			

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	PFr	99	1,16	0,73	0,04	3,28
1	PFr	95	1,24	0,73	0,36	3,96

**Cuadro I:** Análisis de la varianza y medidas resumen PS total

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PS total	194	0,67	0,27	43,21

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26,77	105	0,25	1,69	0,0059
Tratamiento	0,91	1	0,91	6,63	0,0115
Tratamiento>Plantín	13,97	102	0,14	0,91	0,6841
Tiempo	11,49	1	11,49	76,04	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,41	1	0,41	2,69	0,1046
Error	3,29	88	0,15		
Total	0,07	193			

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	PS total	99	0,83	0,39	0,14	1,90
1	PS total	95	0,97	0,51	0,22	2,48

**Cuadro J:** Análisis de la varianza y medidas resumen PSt

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PSt	194	0,63	0,19	44,77

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8,69	105	0,08	1,44	0,0391
Tratamiento	0,50	1	0,50	10,72	0,0015
Tratamiento>Plantín	4,80	102	0,05	0,82	0,8344
Tiempo	3,20	1	3,20	55,65	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,19	1	0,19	3,24	0,0752
Error	5,06	88	0,06		
Total	13,75	193			

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	PSt	99	0,49	0,22	0,10	1,06
1	PSt	95	0,59	0,30	0,14	1,48

**Cuadro K:** Análisis de la varianza y medidas resumen PSr

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PSr	194	0,70	0,34	45,98

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,42	105	0,01	1,96	0,0006
Tratamiento	0,01	1	0,01	1,29	0,2583
Tratamiento>Plantín	0,75	102	0,01	1,08	0,3642
Tiempo	0,64	1	0,64	93,48	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,01	1	0,01	1,58	0,2117
Error	0,61	88	0,01		
Total	2,02	193			

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	PSr	99	0,17	0,09	0,02	0,42
1	PSr	95	0,19	0,11	0,04	0,60

**Cuadro L:** Análisis de la varianza Esbeltez

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Esbeltez	3644	0,82	0,81	22,72

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	38380,90	145	264,70	109,03	<0,0001
Tratamiento	124,28	1	124,28	2,50	0,1157
Tratamiento>Plantín	6945,63	140	49,61	20,44	<0,0001
Tiempo	31209,17	2	15604,59	6427,62	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	101,83	2	50,91	20,97	<0,0001
Error	8492,24	3498	2,43		
Total	46873,14	3643			

**Cuadro M:** Análisis de la varianza y medidas resumen Esbeltez por tiempo

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
1	Esbeltez	1295	3,9E-04	0,00	31,18

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,39	1	0,39	0,50	0,4797
Tratamiento	0,39	1	0,39	0,50	0,4797
Error	1019,74	1293	0,79		
Total	1020,13	1294			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
2	Esbeltez	1259	0,03	0,03	25,27

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	176,17	1	176,17	38,33	<0,0001
Tratamiento	176,17	1	176,17	38,33	<0,0001
Error	5778,19	1257	4,60		
Total	5954,37	1258			

Tiempo	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
3	Esbeltez	1090	0,01	4,5E-03	25,29

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	36,31	1	36,31	5,97	0,0147
Tratamiento	36,31	1	36,31	5,97	0,0147
Error	6612,75	1088	6,08		
Total	6649,06	1089			

Tiempo	Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
1	0	Esbeltez	636	2,83	0,75	1,40	6,40
1	1	Esbeltez	659	2,86	1,00	1,27	8,40
2	0	Esbeltez	625	8,86	2,49	2,75	32,00
2	1	Esbeltez	634	8,11	1,74	1,03	22,00
3	0	Esbeltez	536	9,93	2,50	4,83	25,00
3	1	Esbeltez	554	9,57	2,43	5,00	19,00

**Cuadro N:** Análisis de la varianza y medidas resumen Tallo-Raíz

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
Tallo-Raíz	194	0,55	0,01	30,66

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	102,83	105	0,98	1,01	0,4839
Tratamiento	4,11	1	4,11	5,39	0,0222
Tratamiento>Plantín	77,80	102	0,76	0,79	0,8795
Tiempo	20,65	1	20,65	21,29	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,26	1	0,26	0,27	0,6076
Error	85,36	88	0,97		
Total	188,19	193			

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>D.E.</u>	<u>Mín</u>	<u>Máx</u>
0	Tallo-Raíz	99	3,07	0,96	1,43	7,40
1	Tallo-Raíz	95	3,36	1,00	1,29	7,00

**Cuadro Ñ:** Análisis de la varianza y medidas resumen Lignificación

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
Lignificación	194	0,62	0,16	21,24

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo	2925,19	105	27,86	1,35	0,0713
Tratamiento	0,07	1	0,07	3,7E-03	0,9515
Tratamiento>Plantín	1975,96	102	19,37	0,94	0,6160
Tiempo	948,66	1	948,66	43,13	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	0,50	1	0,50	0,02	0,8767
Error	1809,76	88	20,57		
Total	4734,95	193			

<u>Tratamiento</u>	<u>Variable</u>	<u>n</u>	<u>Media</u>	<u>D.E.</u>	<u>Mín</u>	<u>Máx</u>
0	Lignificación	99	21,34	5,12	13,96	63,64
1	Lignificación	95	21,37	4,80	11,35	41,07

**Cuadro O:** Análisis de la varianza y medidas resumen Porcentaje de Raíces

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
% Raíces	194	0,89	0,77	85,09

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,12	105	1,2E-03	7,05	<0,0001
Tratamiento	6,8E-05	1	6,8E-05	0,06	0,8106
Tratamiento>Plantín	0,12	102	1,2E-03	7,02	<0,0001
Tiempo	3,8E-03	1	3,8E-03	22,82	<0,0001
Tratamiento*Tiempo	1,4E-04	1	1,4E-04	0,81	0,3692
Error	0,01	88	1,7E-04		
Total	0,14	193			

Tratamiento	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
0	% Raíces	99	0,015	0,025	0,001	0,138
1	% Raíces	95	0,016	0,029	0,001	0,206