

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Sede Esquel

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería forestal



Colonización micorrícica de plantines de “ciprés de la cordillera” (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri) en relación a la disponibilidad nutrientes y agua bajo un sistema de cultivo semicontrolado en contenedores

Julieta E. Askenazi Vera

Tesina

Requerimiento para el otorgamiento del título de Ingeniero Forestal

Esquel, Chubut

Septiembre de 2019

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ingeniería
Sede Esquel

Tesina presentada como requerimiento parcial para el otorgamiento del título de
Ingeniero Forestal

Título: Colonización micorrícica de plantines de “ciprés de la cordillera” (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzari) en relación a la disponibilidad nutrientes y agua bajo un sistema de cultivo semicontrolado en contenedores

Aprobado por los profesores guía:

Ing. Ftal. Diego S. Massone (Director)

Dra. Ing. Ftal. María Eugenia Salgado Salomón (Codirectora)

Acepto que mi tesina sea parte de la colección de la biblioteca de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y que esta Universidad permita consultar mi trabajo a cualquier lector. También firmo que el contenido de este trabajo es de mi autoría.

Julieta E. Askenazi Vera.

Colonización micorrícica de plantines de “ciprés de la cordillera” (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri) en relación a la disponibilidad nutrientes y agua bajo un sistema de cultivo semicontrolado en contenedores

Resumen

Austrocedrus chilensis es una especie endémica de los bosques andino patagónicos, factores como el sobrepastoreo, incendios y el “mal del ciprés” han producido procesos de degradación de estos bosques, afectando superficies importantes. Una restauración activa de los cipresales requiere plantines de calidad, los que pueden ser obtenidos mediante métodos de viverización. Estos métodos por lo general conllevan el uso de fertilizantes que pueden afectar la presencia de micorrizas arbusculares, indispensables para el establecimiento y normal desarrollo de la planta. Por ello, se evaluó en plantines de *A. chilensis* el efecto que causa el fertirriego en el porcentaje de colonización micorrícica. Para ello se establecieron seis tratamientos que consistieron en la combinación de distintos niveles de dos factores estudiados, fósforo y agua, durante su aplicación en la fase de establecimiento. Se aplicaron tres niveles de concentración de fósforo (1, 10 y 100 mg L⁻¹) y dos niveles de humedad del medio de crecimiento (20 % y 80 % de agua aprovechable). De la combinación de los factores se generaron seis tratamientos, los que se identificaron de la siguiente manera: T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100. El porcentaje de micorrizas arbusculares se determinó en lotes de plantines con dimensiones para considerarlos terminados en el vivero, envasados en suelo esterilizado y mantenidos en vivero durante un año y en plantas llevadas a campo luego de una temporada de crecimiento. El porcentaje de micorrizas arbusculares se comportó inversamente proporcional a la disponibilidad de fósforo y del contenido de humedad del medio de crecimiento, la colonización aumenta en plantas llevada a campo independientemente del porcentaje de micorrizas arbusculares que el plantín tenga en el vivero.

Palabras claves: Micorrizas arbusculares, fertilización con fósforo, estrés hídrico.

Agradecimientos

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio, gracias a ustedes hemos logrado tener nuestras profesiones. Orgullo y privilegio de ser sus hijos.

A Ale, Andre ,Vivi, Gus, Tuti, Javi , Santiago y Eduardo, sobrinos/as y cuñados/as que a pesar de haber tomado diferentes caminos siempre están presentes.

A mis amigos que están lejos, y a los de cerca, que siempre acompañaron.

A mi Director Ing. Diego Massone, por darme la oportunidad de ser parte de este trabajo, acompañarme y transmitirme sus conocimientos.

A mi Codirectora Dra. María Eugenia Salgado Salomón, Maru, por su permanente acompañamiento, tanto académica como emocionalmente.

A Angie, por haberme acompañado durante todo el trabajo de ensayo y contribuirme con todo lo que estaba a su alcance.

Al jurado, Dr. Mario Rajchenberg, Lic. Liliana Contardi y el Dr. Gabriel Loguercio, por sus aportes y por el tiempo dedicado a este trabajo.

Al director del Instituto de Biotecnología Esquel, Oscar Troncoso, y a todos los que forman parte.

A la UNPSJB, Universidad pública laica y gratuita, a la sede Esquel y a la Facultad de Ingeniería, donde tuve la oportunidad de formarme y crecer.

A Laura Acheritobehere, por permitirnos hacer la plantación dentro de un predio cercado para su ensayo (Reserva el Guadal ubicada en la zona de Mallín Ahogado en la Ciudad de El Bolsón, Provincia de Río Negro).

Índice

Introducción.....	1
Materiales y Métodos	4
Material vegetal y ambiente de cultivo.....	4
Manejo del agua y del fertirriego.....	6
Tratamientos	7
Porcentaje de colonización de micorrización del tipo arbuscular.....	7
Análisis estadístico	13
Resultados.....	13
Incidencia del fósforo	14
Influencia de los estados hídricos	16
Discusión	17
Conclusiones.....	18
Bibliografía.....	20

Índice de figuras

Figura 1: Ejemplar de <i>A. chilensis</i>	1
Figura 2: Distribución natural de <i>A. chilensis</i> ..	2
Figura 3: Plantines en tubetes. Plantines cultivados en invernadero en tubetes con un sustrato 2:1 turba/perlita.....	5
Figura 4: Plantines de <i>A. chilensis</i> seleccionados para el L2, colocados en recipientes de 1000 ml, con sustrato formado por una proporción 1:1 de tierra y turba rubia <i>spagnum</i> , ambas esterilizadas.	8
Figura 5: Sistema radical de <i>A. chilensis</i> luego de extraerle el sustrato y lavarlo en agua corriente.....	10
Figura 6: Celdas con raicillas de <i>A. chilensis</i> colocadas a baño maría durante 10 minutos para su decoloración.	11
Figura 7: Raíces de <i>A. chilensis</i> dispuestas en la cuadrícula para su correspondiente análisis.	12
Figura 8: Lupa binocular estereoscópica 10X con la cual se realizaron las observaciones.	13
Figura 9: Lote de plantines en tubetes (L1). Colonización micorrícica (MA%) en los diferentes tratamientos de fertilización.....	14
Figura 10: Lote de plantines en envases (L2). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes tratamientos de fertilización.....	15
Figura 11: Lote de plantas a campo (L3). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes tratamientos de fertilización.....	15
Figura 12: Lote de plantines en tubetes (L1). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes estados hídricos aplicados.....	16
Figura 13: Lote de plantines a campo.....	17

Índice de tablas

Tabla 1: Valores promedio del cultivo al finalizar el segundo ciclo de crecimiento.	6
Tabla 2: Concentraciones de las sales fertilizantes utilizadas en las tres soluciones nutricionales de los distintos niveles de fósforo (P).	7

Introducción

Austrocedrus chilensis (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri (ciprés de la cordillera) (Figura 1) se distribuye en la cordillera andina en una franja de no más de 50 km de ancho, formada por una serie de parches de bosque de tamaño variable. En Chile se encuentra entre los límites 32° 39' S y 44° S, mientras que en Argentina lo hace entre los 39° 30' S y 43° 44' S (Gallo et al. 2004) (Figura 2).



Figura 1: Ejemplar de *A. chilensis*. Foto: Dra. ME Salgado Salomón.



Figura 2: Distribución natural de *A. chilensis* en Argentina. Fuente: Pastorino et al. 2015.

Los bosques de *A. chilensis*, a pesar de cubrir superficies no tan extensas como otras especies nativas (lenga, ñire y coihue), son bosques de gran valor ecológico, forestal y paisajístico. En general, el bosque andino patagónico se encuentra degradado siendo las principales causas incendios antrópicos o asociados a actividades ganaderas, sobrepastoreo, plagas y enfermedades (Bava et al. 2006, Cruz 2015). Los bosques de *A. chilensis* de la región andino patagónica no son una excepción, se encuentran seriamente degradados en gran parte su área de distribución, con consecuencias económicas y ambientales (Bava et al. 2006, La Manna et al. 2014). *Austrocedrus chilensis* sufre una mortandad masiva, causada por *Phytophthora austrocedri*, denominada “mal del ciprés”, que es causa de degradación y puede llegar en situaciones extremas a producir reducción de la superficie de bosque (Carabelli & Claverie 2005). Los bosques con mal de ciprés, sin ganado o con escaso ganado regeneran muy bien (Loguercio et al. 2018), y por ello solo cuando ambos factores son muy intensos se produce reducción de superficie del bosque. En estudios realizados sobre la distribución de la enfermedad, el avance de la misma y los factores asociados muestran que se encuentra ampliamente distribuida, y que la superficie afectada aumenta de manera alarmante (La Manna et al. 2008, La Manna & Matteucci 2012, La Manna et al. 2014).

Además, los bosques afectados por esta enfermedad ven disminuidas sus posibilidades de manejo silvicultural con fines productivos (Loguercio & Rachjenberg 2014, Loguercio et al 2018).

La simbiosis micorrícica es una asociación mutualista entre las raíces de las plantas y diferentes hongos del suelo, que le permiten a la planta aumentar su capacidad de absorción de agua y nutrientes esenciales para la vida del vegetal (Fernández et al. 2013). Se sabe que la simbiosis micorrícica le otorga beneficios a las plantas frente a la presencia de patógenos en ambientes boscosos (Smith & Read 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que las especies micorrícicas poseen capacidades antagónicas o fungiestáticas para algunas enfermedades forestales, principalmente de raíz (Vierheilig et al. 2008, Wehner et al. 2010, Veresoglou & Rillig 2012, Manila & Nelson 2013). *Austrocedrus chilensis* es micorrícico arbuscular obligado, no pudiendo establecerse ni crecer en ausencia de las mismas (Singer 1969). Estas especies de hongos forman parte de la biota autóctona de los sitios con aptitud forestal de toda la Patagonia (Martínez et al. 2007). Fontenla et al. (1998) determinaron la presencia de micorrizas arbusculares (MA) en poblaciones naturales de *A. chilensis* en el Parque Nacional Nahuel Huapi, además se encontraron MA en la mayoría de las especies acompañantes (*Maytenus boaria* Mol., *Aristotelia chilensis* Mol. Stuntz, *Mutisia decurrens* Cav., *Mutisia spp.*). En Chile, Godoy & Mayr (1989) mencionan que la mayoría de las especies de coníferas poseen una extraordinaria capacidad de adaptación, pues sobreviven frecuentemente bajo condiciones extremas, condición que estaría muy relacionada al papel que cumplen las asociaciones micorrícicas en estas especies.

En vivero, la práctica de aplicar fertilizante a través del riego no es una decisión arbitraria, varios autores mencionan que entre otros beneficios, la aplicación del mismo acorta los ciclos de producción y permite obtener plantines de la calidad deseada (Landis et al. 1985, Romero et al. 1986, Enricci & Massone 2003, Escobar 2007). El fertirriego permite aplicar los nutrientes en forma ajustada al área donde se concentran las raíces, aumentando la eficiencia del fertilizante. Por otro lado, es posible adecuar la cantidad y la concentración de los nutrientes de acuerdo con su demanda, durante las diferentes etapas de crecimiento del cultivo (Landis et al. 1989b). Sin embargo, el uso de fertirriego que conlleva altas dosis de nitrógeno y fósforo, usado en medios de crecimiento artificiales, se traduce en una disminución de la micorrización (Landis et al. 1989a, Martínez et al. 2007, Salgado Salomón et al. 2009).

Fernández et al. (2013) indican que al disminuir las dosis de nutrientes que se aplican en los invernaderos, las micorrizas comienzan a crecer y a aparecer en las raíces de las plantas. Salgado Salomón et al. (2009) sugirieron que el manejo de la micorrización bajo sistemas que reciben fertilización requiere un estudio detallado para cada caso, dado que existen reportes contradictorios sobre el efecto inhibitorio de la fertilización sobre la micorrización, dependiendo de las especies arbóreas y fúngicas involucradas.

Considerando que *A. chilensis* se encuentra en la Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas (Souto & Gardner 2013) ocupando la categoría de “casi amenazado” (*near threatened* NT), es necesario implementar acciones para lograr su recuperación y conservación. Uno de los requisitos para llevar a cabo una restauración activa de los cipresales es contar con un sistema eficiente de producción masiva de plantines de *A. chilensis*. Si bien aún se continúan utilizando métodos tradicionales de bajo aporte tecnológico, existen tecnologías modernas para la producción de plantines forestales que se basan en el cultivo sobre sustrato inerte en contenedores, con fertirriego dentro de invernáculos (Massone et al. 2018).

Por lo expuesto, se plantea como hipótesis que en plantines de *A. chilensis* obtenidos mediante métodos de viverización con altos niveles de fertilizante y condiciones hídricas adecuadas, la micorrización estará inhibida. Por otra parte, al tratarse de especies de hongos cosmopolitas, se postula que los plantines pueden ser micorrizados una vez llevados a campo.

Bajo esta hipótesis se plantean como objetivos: (i) evaluar la influencia de distintas disponibilidades de fósforo y estados hídricos del sustrato en el nivel de infección micorrízica durante la viverización y (ii) evaluar si se produce la colonización en vivero o si los plantines son micorrizados una vez que son plantados a campo.

Materiales y Métodos

Material vegetal y ambiente de cultivo

Los plantines utilizados en este estudio se cultivaron en el invernadero de ensayos del vivero de la Unidad de Propagación vegetal, Instituto de Biotecnología Esquel, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UPV - INBIES – UNPSJB). Se utilizaron tubetes individuales de un volumen de 250 ml. Los tubetes se

ubicaron en bandejas porta-tubetes con capacidad para 56 unidades, con una densidad de cultivo de 207 plantas por m². Como sustrato se utilizó una mezcla formada por dos partes de turba y una parte de perlita (Figura 3). Para el presente ensayo no se aplicó inoculación exógena, es decir, no se empleó inoculante en ninguna etapa de la viverización, ni en el campo.



Figura 3: Plantines en tubetes. Plantines cultivados en invernadero en tubetes con un sustrato 2:1 turba/perlita. Foto: Ing. Ftal. D.S. Massone.

Se utilizó fertirrigación para el manejo de la nutrición durante la viverización, o sea la provisión de fertilizantes a través del agua de riego. Este método distingue distintas fases de crecimiento, caracterizadas no sólo por la etapa fenológica por la que transita la plántula sino también por un manejo determinado de distintos factores que tienen incidencia en el desarrollo del cultivo (i.e. disponibilidad de agua y nutrientes entre los principales), buscando objetivos específicos para cada etapa de desarrollo. Las fases de crecimiento que formaron parte del ciclo de cultivo de este ensayo fueron:

Establecimiento: transcurrió desde la emergencia de la plántula hasta el comienzo del crecimiento del epicótilo, por un lapso de tiempo de 6 semanas, extendiéndose desde el 15 de septiembre hasta el 30 de octubre.

Crecimiento rápido: abarcó desde el final del establecimiento hasta lograr aproximadamente el 80 % del tamaño de planta buscado, extendiéndose por 8 semanas, entre noviembre y diciembre.

Rustificación: se desarrolló desde el final del crecimiento rápido hasta el detenimiento del crecimiento radicular (ausencia de puntas blancas), transcurriendo aproximadamente 16 semanas, durante los meses de enero, febrero, marzo y abril.

El cultivo pasó por dos ciclos de crecimiento en vivero, desde septiembre de 2014 a abril de 2016 (plug 1) separados uno de otro por una etapa de dormancia, obteniéndose plantines con características morfológicas adecuadas para su plantación a campo (tabla 1). La etapa de dormancia transcurre desde el detenimiento del desarrollo radical hasta su reactivación, abarcando los meses invernales. Las fases de crecimiento se repitieron en el segundo ciclo de viverización con la misma duración que en el primer ciclo.

Tabla 1: Valores promedio del cultivo al finalizar el segundo ciclo de crecimiento. Altura de la parte aérea (h), diámetro al cuello (diam.), Biomasa anhidra de la parte aérea (BSA), radical (BSR), total (BST) y asignación de biomasa (BSA/BSR).

Valores promedio \pm desvío estándar					
h (mm)	diam. (mm)	BSA (g)	BSR (g)	BST (g)	BSA/BSR
167,34 \pm 34,48	3,63 \pm 0,48	3,98 \pm 1,37	2,21 \pm 0,80	6,18 \pm 2,13	1,83 \pm 0,25

Manejo del agua y del fertirriego

Una vez producida la germinación, la frecuencia de riego se estableció usando el método de las pesadas (Landis et al. 1989b), utilizando el nivel de agua aprovechable (AA) del sistema contenedor-planta en la fase de establecimiento como indicador para efectuar el riego al 20% u 80 % (según el tratamiento), al 50 % en pleno crecimiento y al 40% en la rustificación.

El riego se aplicó en forma manual mediante la utilización de un kit de riego formado por una bomba periférica y un aplicador en forma de roseta. Tanto en la fase de crecimiento rápido como en la de rustificación se utilizaron soluciones fertilizantes únicas para todos los tratamientos del ensayo. En la fase de establecimiento se usaron diferentes soluciones fertilizantes según los tratamientos aplicados.

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la combinación de distintos niveles de los dos factores estudiados, fósforo y agua, durante su aplicación en la fase de establecimiento. Se aplicaron tres niveles de la variable concentración de fósforo (1, 10 y 100 mg L⁻¹) y dos niveles de contenido hídrico del medio de crecimiento (20 % y 80 % del AA). De la combinación de estos se generaron seis tratamientos, los que se identificaron de la siguiente manera: T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100. Para generar los tres niveles de concentración de fósforo, se diseñaron distintas soluciones nutritivas teniendo en cuenta los 10 mg L⁻¹ de potasio, 4 mg L⁻¹ de magnesio, 19 mg L⁻¹ de sulfatos y 67 mg L⁻¹ de calcio, aportados por el agua de riego usada en el ensayo (Tabla 2). Los estados hídricos se determinaron mediante el método de las pesadas.

Tabla 2: Concentraciones de las sales fertilizantes utilizadas en las tres soluciones nutricionales de los distintos niveles de fósforo (P).

Nivel de concentración de P	Soluciones nutritivas expresadas en gramos de sales fertilizantes hidrosolubles por litro de agua
1 mg L ⁻¹	0,02 COMPO® HAKAPHOS violeta (7-12-40); 0,065 NO ₃ K; 0,19 (NO ₃) ₂ Mg.
10 mg L ⁻¹	0,02 COMPO® HAKAPHOS violeta (7-12-40); 0,065 NO ₃ K; 0,19 (NO ₃) ₂ Mg.; *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %.
100 mg L ⁻¹	0,26 KH ₂ PO ₄ ; 0,3 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; *0,02 H ₃ PO ₄ al 85 %.

*. Mililitros (ml)

Porcentaje de colonización de micorrización del tipo arbuscular (%MA)

El análisis de abundancia de colonización MA se realizó sobre tres lotes de plantines (L1, L2 y L3), por cada uno de ellos se seleccionaron al azar ocho plantines de cada tratamiento (T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100).

L1: Análisis para determinar inhibición de colonización de MA, en relación a la concentración de P y %HA. El análisis se efectuó inmediatamente después del ciclo

de cultivo, es decir, directamente sobre plantines una vez que los mismos concluyeron su segundo ciclo de crecimiento.

L2: Análisis utilizado para determinar presencia de inóculo en vivero, en el caso de no registrarse colonización en L1. Para ello, a un lote de los plantines iniciales se los envasó en contenedores nuevos de 1000 ml, una vez que concluyó el segundo ciclo de crecimiento (Figura 4). Para los envases se utilizó una mezcla formada por una proporción 1:1 de tierra esterilizada mediante tres tinalizaciones de una hora de duración y turba rubia *spaghnum* esterilizada en estufa a 105 °C durante 72 hs (Salgado Salomón et al. 2009). Las plantas envasadas se mantuvieron durante una temporada de crecimiento en invernadero, interviniéndolas solamente con dos aplicaciones semanales de agua de perforación. En este caso las medidas tomadas en lo que respecta a la elección del sustrato como así también al agua utilizada para regar, se realizaron con el criterio de evitar cualquier fuente de contaminación externa que pudiera aportar MA. Las plantas fueron envasadas en el mes de septiembre permaneciendo en los envases durante 13 meses, extrayéndolas para realizarles los análisis en el mes de octubre del año siguiente.



Figura 4: Plantines de *A. chilensis* seleccionados para el L2, colocados en recipientes de 1000 ml, con sustrato formado por una proporción 1:1 de tierra y turba rubia *spaghnum*, ambas esterilizadas.

L3: Análisis para determinar %MA una vez que los plantines son establecidos en campo. La plantación se realizó en el mes de septiembre en un bosque puro de *A. chilensis* (41° 52' 08" S, 71° 29' 15" W, 564 msnm). El sitio presentaba baja densidad de sotobosque, una pendiente del 5% con exposición noroeste y un suelo con textura franco arenosa formada por 2,3% de arcilla, 12,4 de limo y 85,4 de arena. El mismo se encontraba dentro de la Reserva el Guadal ubicada en la zona de Mallín Ahogado en la Ciudad de El Bolsón, Provincia de Río Negro. Las plantas fueron cosechadas en el mes de octubre del año siguiente, permaneciendo en campo durante 13 meses. La extracción de las plantas se efectuó con pala, teniendo los recaudos necesarios para romper la menor cantidad de raíces posibles. Una vez que se descalzaba la planta se colocó rápidamente el cepellón en una bolsa de nylon para evitar la pérdida de humedad en las raíces hasta el momento de realizarle el análisis.

Para realizar el análisis del %MA se utilizó la metodología adaptada por Cázares & Trappe (1993). La misma consiste en lavar en agua corriente los sistemas radicales (mínimo 10 min.) (Figura 5). Posteriormente se seccionan raíces secundarias por un total de 150 cm, en porciones de aproximadamente 2,5 cm de largo y se colocan en celdas plásticas Tissue-Tek (Fisher Scientific Co. Pittsburgh, PA) para la decoloración.



Figura 5: Sistema radical de *A. chilensis* luego de extraerle el sustrato y lavarlo en agua corriente (plantín correspondiente a L2).

Para la decoloración se colocaron las celdas con las raicillas en KOH al 10% (100 ml de H₂O destilada – 10 gr de KOH) y se llevó a 100 °C en baño maría durante 10 min (Figura 6). Se enjuagaron con agua corriente 5 veces, y se escurrieron en papel absorbente. Luego se decoloran en H₂O₂ al 15% durante 24 hs. a temperatura ambiente. Se lavaron en agua corriente 5 veces, y se escurrieron en papel absorbente.

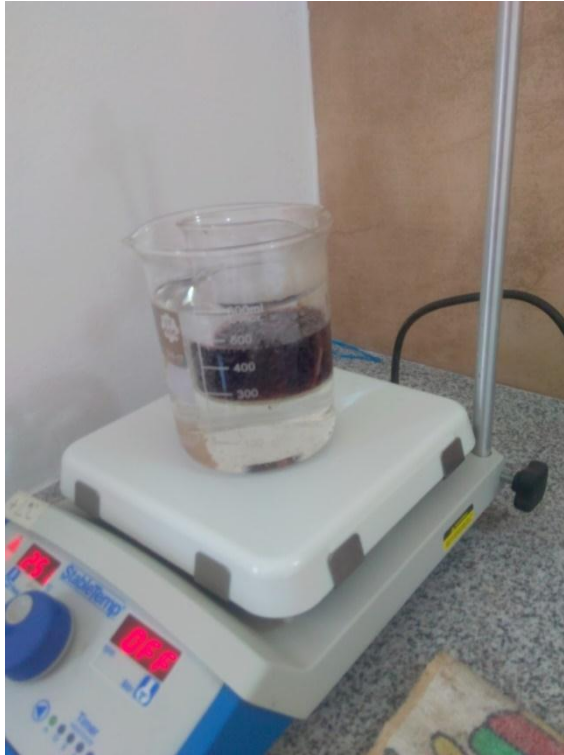


Figura 6: Celdas con raicillas de *A. chilensis* colocadas a baño maría durante 10 minutos para su decoloración.

La tinción se realizó en azul de tripano en lactoglicerol al 0,05% (proporción 3:1:1 glicerina: Ac. Láctico: H₂O, 0,005 gr de azul de tripano en 1000 ml de lactoglicerol) durante 30 min a 4 °C.

Por último, se almacenaron perfectamente identificadas en lactoglicerol a 4 °C hasta el examen microscópico.

El porcentaje de colonización con MA se estimó mediante el método usado por Salgado Salomón et al. (2009), basado en el método de intersección (Figura 7) expresado en la siguiente ecuación (ecuación 1) y se aplicó el método sobre los tres lotes de plantines:

$$\%MA = (IM / IT) \times 100$$

Siendo:

%MA: porcentaje de colonización con hongos del tipo arbuscular del sistema radical, expresado en porcentaje (%)

IM: intersecciones con raíz micorrizada.

IT: intersecciones totales.



Figura 7: Raíces de *A. chilensis* dispuestas en la cuadrícula para su correspondiente análisis.

El método de intersección se efectuó sobre una caja de Petri a la que se le diseñó un fondo con una grilla cuadrículada de 1 cm x 1 cm y consistió en el conteo de la cantidad de intersecciones de cada sistema radical y la cuadrícula de la grilla. Sobre esta grilla se distribuyeron homogéneamente las muestras de raíces y se efectuaron los conteos de las intersecciones de las raíces con la líneas de la grilla en un primer término los cruces en las líneas horizontales y luego en las verticales, identificando como SI a las intersecciones con raíces micorrizadas (teñidas de azul) y como NO la intersecciones con raíces no micorrizadas (no teñidas). Las observaciones se realizaron con una lupa binocular estereoscópica 10X (Bansch y Lomb) (Figura 8). De los casos positivos se realizó una sub-muestra de alrededor del 10% del material para verificar que la tinción efectivamente se debía a estructuras pertenecientes a las MA (i.e. vesículas, arbuscúlos, *coils* e hifas inter o intracelulares), estas observaciones se realizaron con un microscopio

óptico Leica DM500 en 100X.



Figura 8: Lupa binocular estereoscópica 10X con la cual se realizaron las observaciones.

Análisis estadístico

El análisis de la estimación del porcentaje de colonización con hongos MA (%MA) entre los tratamientos se realizó con un modelo lineal generalizado mixto (3W-GLMM). El %MA fue considerada la variable de respuesta, la concentración de P fue considerada una variable fija y el contenido hídrico del medio de crecimiento fue incorporada como variable aleatoria (Di Rienzo et al. 2010). Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia de 0.05, con el paquete estadístico InfoStat para Windows versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017).

Resultados

La interacción de los factores concentración de P y contenido hídrico, no fue significativa ($p < 0,05$) para ninguno de los lotes (L1, L2 y L3) analizados, de manera que los factores actuaron de forma independiente.

Incidencia del fósforo (P)

Para el lote de plantines en tubetes (L1) se observó que existen diferencias significativas ($F=122,62$; $p<0,0001$; 3W-GLMM). El porcentaje de plantas que exhibieron estructuras micorrícicas varió de un mínimo de 7 % a un máximo de 52 % (Figura 9).

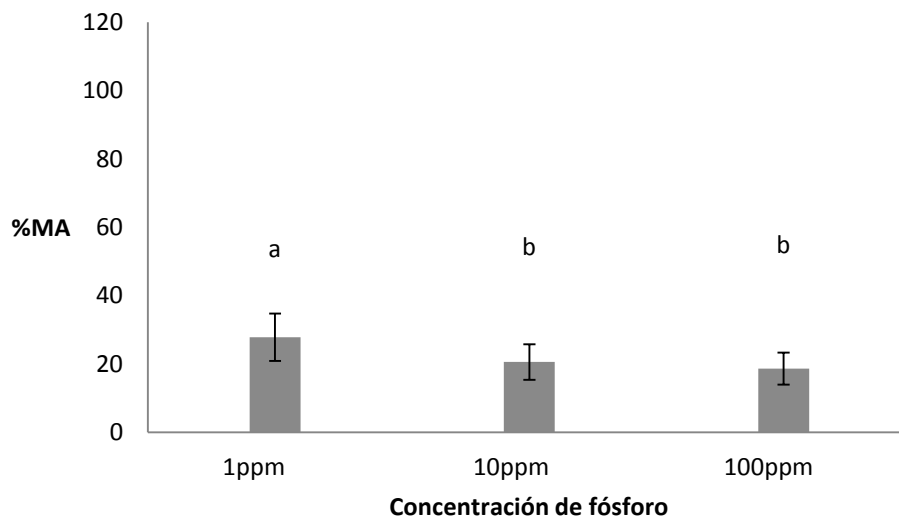


Figura 9: Lote de plantines en tubetes (L1). Colonización micorrícica (MA%) en los diferentes tratamientos de fertilización aplicados en la etapa de viverización. Distintas letras indican diferencias significativa entre tratamientos con $p<0,05$ (3W-GLMM).

Se observaron diferencias significativas para el lote de envases (L2) ($F=43,53$; $p<0,0001$; 3W-GLMM). El porcentaje de plantas que exhibieron estructuras micorrícicas oscilo en el caso de envases (L2) entre un mínimo de 25%, alcanzando un valor máximo de colonización de 100 %, solo en cuatro ejemplares la colonización no supero el 11%.,(Figura 10).

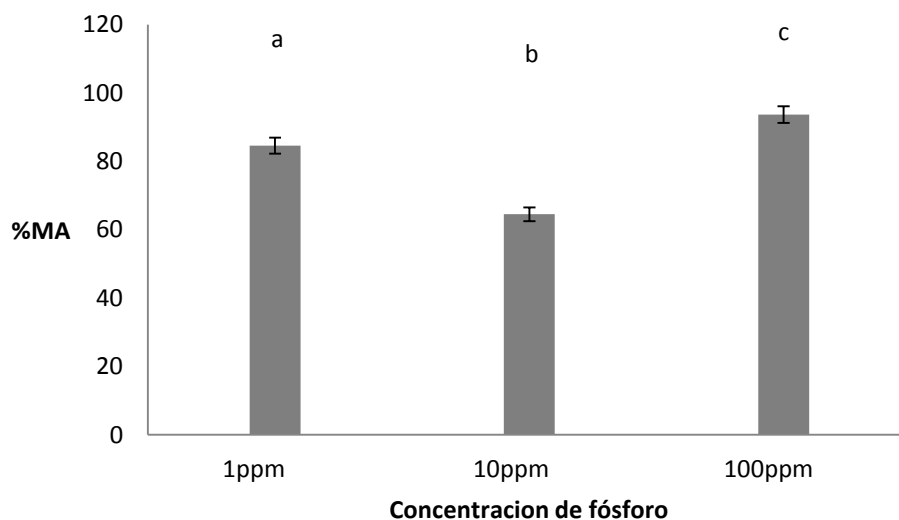


Figura 10: Lote de plantines en envases (L2). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes tratamientos de fertilización aplicados en la etapa de viverización. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos con $p < 0,05$ (3W-GLMM).

Mientras que para las plantas en campo (L3), no se registraron diferencias significativas ($F=15,05$; $p < 0,003$; 3W-GLMM), (Figura 11). Los porcentajes de micorrización para el lote de campo (L3) fueron por encima del 70% hasta 100%, salvo un ejemplar que presentó el 65% de colonización, el valor promedio de colonización para el L3 es de 93 %.

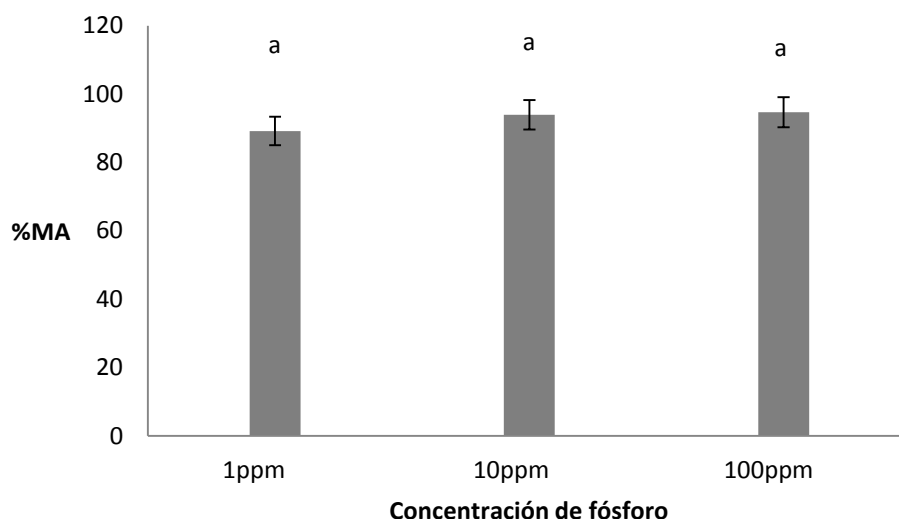


Figura 11: Lote de plantas a campo (L3). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes tratamientos de fertilización aplicados en la etapa de viverización. Letras iguales indican que no existe una diferencia significativa entre tratamientos con $p < 0,05$ (3W-GLMM).

Influencia de los estados hídricos

En el lote tubetes (L1) se observan diferencias significativas en relación a la disponibilidad de agua ($F= 122,62$; $p < 0,0001$; 3W-GLMM) (Figura 12).

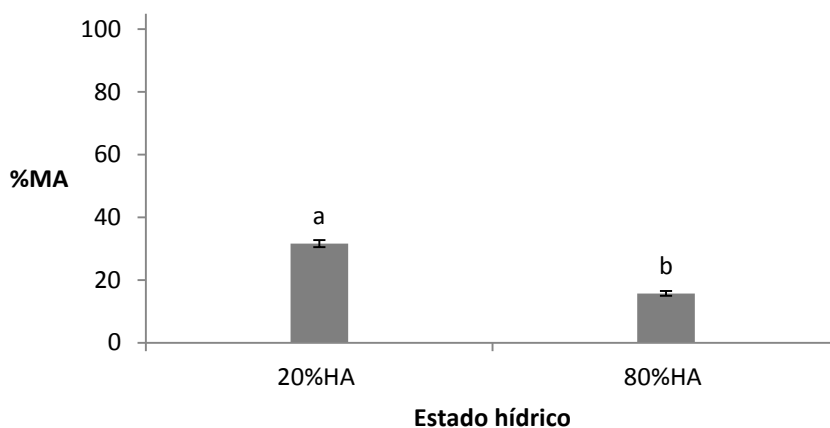


Figura 12: Lote de plantines en tubetes (L1). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes estados hídricos aplicados en la etapa de viverización. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos con $p < 0,05$ (3W-GLMM).

Para el L2 (plantines en maceta) no existieron diferencias significativas ($F=0,32$; $p < 0,5771$; 3W-GLMM) (Figura 13).

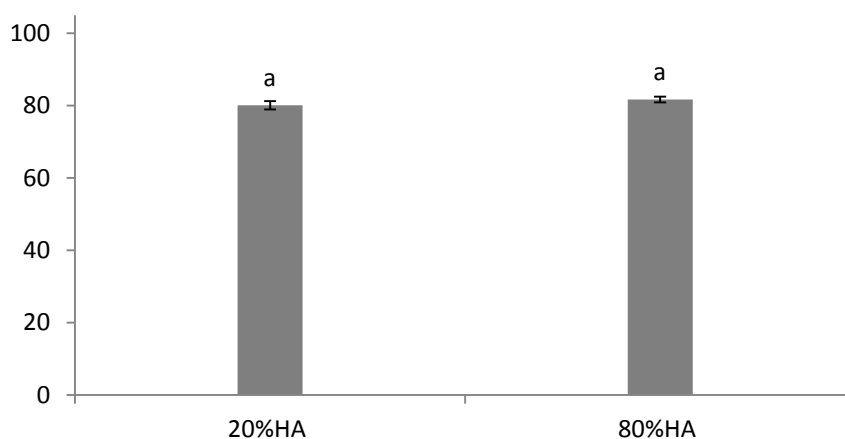


Figura 13: Lote de plantines en tubetes (L2). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes estados hídricos aplicados en la etapa de viverización. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos con $p < 0,05$ (3W-GLMM).

En el caso de los ejemplares a campo (L3), se observaron diferencias significativas en el factor contenido hídrico ($F= 15,05$; $p<0,0003$; 3W-GLMM) (Figura 14)

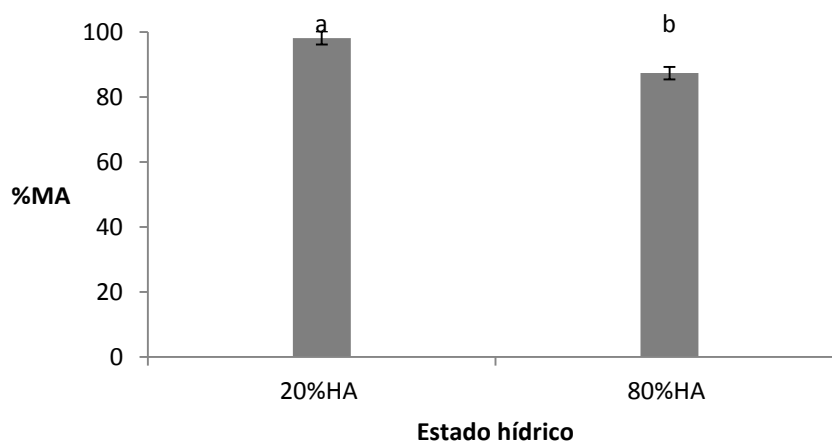


Figura 14: Lote de plantines a campo (L3). Colonización micorrícica (MA%) según los diferentes estados hídricos aplicados en la etapa de viverización. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre tratamientos con $p<0,05$ (3W-GLMM).

Discusión

Este es el primer estudio que investiga la influencia de la fertilización y la disponibilidad de agua sobre la colonización micorrícica en plantines de *Austrocedrus chilensis* y, considerando el status “*near threatened*” (UICN) que ha alcanzado la especie, adquiere importancia a la hora de implementar medidas de recuperación y conservación para la misma. Los resultados del ensayo mostraron que en los plantines obtenidos mediante métodos de viverización con altos niveles de fertilizante y adecuadas condiciones hídricas, la micorrización está parcialmente inhibida. Sin embargo, la presencia de micorrizas en las plántulas de *A. chilensis* desde la estadía en vivero no es nula, pese a no haberse aplicado inoculación exógena, por lo que el origen del inóculo es fortuito, es posible que la colonización se haya generado por la presencia de fuentes exógenas en el predio donde se encuentra el invernadero donde se estableció parte del ensayo.

Con respecto a los niveles de fertilización, los resultados de la presente tesina concuerdan con lo observado por Eissenstat et al. (2015), quienes ensayaron el efecto de la fertilización sobre el %MA en seis especies de árboles templados, observando que en

todas las especies la fertilización condujo a una menor colonización de micorrizas arbusculares. Salas & Blanco (2000) realizaron un estudio de selección de plantas hospederas y el efecto del fósforo para la producción de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares y encontraron que, en presencia de fósforo, el chile dulce (*Capsicum annum* L.) y el maíz (*Zea mays* L.) presentaban una disminución significativa en la colonización micorrícica.

La abundancia de colonización resultó mayor en plantines del lote tubetes (L1) en los cuales fueron sometidos a estrés hídrico (% 20 HA), esta diferencia entre los tratamientos de contenido hídrico (20%HA y 80%HA) se mantuvo aun cuando se retira el manejo de los mismos y se establecen las plantas a campo (L3). En este sentido, Boyer et al. (2015) encontraron que los hongos micorrícicos arbusculares inciden sobre la tolerancia a la sequía de la fresa cultivada (*Fragaria × ananassa*), y que, en diferentes condiciones de estrés hídrico, existe una mayor colonización de la raíz. Por otra parte, Porcel & Ruiz-Lozano (2004) analizaron la influencia de las micorrizas arbusculares en plantas de soja sometidas a estrés por sequía, los resultados mostraron que las plantas de soja con MA estaban protegidas contra la sequía y presentaban una producción de brotes significativamente mayor frente a aquellas plantas que no habían sido micorrizadas. Dado que la tendencia se observó en plantines llevados a campo (L3) es necesario realizar más estudios para dilucidar el rol que podrían estar jugando las MA en el establecimiento de *A. chilensis* en situaciones de sequía.

La tasa de colonización de la raíz por los hongos micorrícicos aumenta significativamente una vez que son plantados a campo, lo cual confirma la presencia del inóculo en el suelo en un bosque puro de *A. chilensis*. Estos resultados concuerdan con lo observado por Fontenla et al. (1998), quienes indican que la especie en cuestión y la vegetación asociada a estos bosques poseen micorrización del tipo arbuscular, y que puede ser compartida.

Conclusiones

El %MA de plantines de *A. chilensis* cultivados en vivero es influenciado por los niveles de concentración de fósforo y el estado hídrico del medio de crecimiento durante la fase de establecimiento del cultivo.

El %MA se comportó inversamente proporcional a la disponibilidad de fósforo y del contenido hídrico del medio de crecimiento.

El proceso de colonización micorrícica se produjo en el vivero, a pesar de que la misma se encuentre inhibida parcialmente por el manejo de fertirrigación y agua llevado adelante durante la viverización.

El %MA aumenta una vez que la planta es llevada a campo (bosque puro de *A. chilensis*) independientemente del %MA con que el plantín llega del vivero.

El presente trabajo genera antecedentes sobre el comportamiento de la colonización micorrícica en plantines forestales que se basan en el cultivo sobre sustrato inerte en contenedores con fertirriego dentro de un invernadero.

Bibliografía

- Bava JO, Lencinas JD, Haag A. 2006. Determinación de la materia prima disponible para proyectos de inversión forestales en cuencas de la provincia de Chubut. Informe Parcial. Consejo Federal de Inversiones. 85 pp.
- Boyer LR, Brain P, Xu XM, Jeffries P. 2015. Inoculation of drought-stressed strawberry with a mixed inoculum of two arbuscular mycorrhizal fungi: effects on population dynamics of fungal species in roots and consequential plant tolerance to water deficiency. *Mycorrhiza* 25(3): 215-227. DOI: 10.1007/s00572-014-0603-6.
- Carabelli F, Claverie H. 2005. Análisis de cambios en los paisajes de bosques de Ciprés de la Cordillera en el Noroeste de la Provincia de Chubut. En: Actas I Reunión sobre ecología, conservación y uso de los bosques de Ciprés de la Cordillera. 28-30 abril. Esquel. Chubut. Argentina.
- Cázares E, Trappe JM. 1993. Vesicular endophytes in roots of Pinaceae. *Mycorrhiza* 2: 153-156.
- Cruz G. 2015. Ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. et Bizarri). Antecedentes ecológicos para la conservación de las comunidades en el Alto Cachapoal. Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ISBN: 978-956-19-0904-5
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Di Rienzo JA, Macchiavelli RE, Casanoves F. 2010. Manual del Usuario InfoStat. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Eissenstat DM, Kucharski JM, Zadworny M, Adams TS, Koide RT. 2015. Linking root traits to nutrient foraging in arbuscular mycorrhizal trees in a temperate forest. *New Phytologist* 208: 114–124.
- Enricci JA, Massone DS. 2003. Producción de plantines plug+0 de *Austrocedrus chilensis* en Patagonia Argentina. XII Congreso Forestal Mundial. Canada.

- Escobar R. 2007. Manual de Viverización, *Eucalyptus globulus* a raíz cubierta. Proyecto “Desarrollo de estándares de origen de la semilla y calidad de la planta para el aumento de la productividad en plantaciones y bosques naturales”. INNOVA. CHILE – CORFO. 230 p.
- Fernández NV, Marchelli P, Fontenla S. 2013. Ectomycorrhizas Naturally Established in *Nothofagus nervosa* seedlings under different cultivation practices in a Forest nursery. *Microbial Ecology*. ISSN 0095-3628. *Microb Ecol* DOI 10.1007/s00248-013-0229-9
- Fontenla S, Godoy R, Rosso P, Havrylenko M. 1998. Root associations in *Austrocedrus* forests and seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizas, *Mycorrhiza* 8:29-33.
- Gallo L, Pastorino MJ, Donoso C. 2004. Variación en *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser et Bizzarri (Ciprés de la Cordillera). Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Chile. Editorial Universitaria. p. 233-252.
- Godoy R, Mayr R. 1989. Caracterización morfológica de micorrizas VA en coníferas del Sur de Chile. *Bosque* 10(2): 89-98.
- La Manna L, Greslebin AG, Mateucci SD. 2014. Avance de la mortalidad de los bosques de *Austrocedrus chilensis* a escala de paisaje. *Revista de la Asociación Argentina de Ecología de Paisajes* 5: 17-24.
- La Manna L, Mateucci SD. 2012. Spatial and temporal patterns at small scale in *Austrocedrus chilensis* diseased forests and their effect on disease progression. *European Journal of Forest Research* 131: 1487-1499.
- La Manna L, Mateucci SD, Kitzberger T. 2008. Abiotic factors related to the incidence of the *Austrocedrus chilensis* disease syndrome at landscape scale. *Forest Ecology and Management* 256: 1087-1095.
- Landis T. 1985. Mineral nutrition as an index of seedling quality. En Duryea, M. (Ed): *Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of mayor test*. Forest Research Lab. Oregon State University Corvallis. p. 29-48.

- Landis T, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP. 1989a. Seedling Nutrition and Irrigation, Volume 4. The Container Tree Nursery Manual. Agric.Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 41-89.
- Landis T, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP. 1989b. The Container Tree Nursery Manual, Volume 5. The Biological Component: Nursery Pests and Micorrhizae. Agric.Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 101-167.
- Loguercio G. A. & Rajchenberg M. 2004. “El Mal del ciprés y la silvicultura del ciprés de la cordillera”. En *Ecología y Manejo de los Bosques Nativos Argentinos*. Arturi M., J. Frangi J. & J. Goya (ed.). EDULP. ISBN 950-34-0307-3. versión digital. 18 pag.
- Loguercio G.A., M.F. Urretavizcaya, M. Caselli y G. Defossé 2018. Manejo forestal de bosques de ciprés de la cordillera afectados por el mal del ciprés y posibilidad de conversión a bosques mixtos de ciprés-coihue. En: PJ Donoso, A Promis, DP Soto (Eds.), *Silvicultura en bosques nativos. Experiencias en silvicultura y restauración en Chile, Argentina y el Oeste de los Estados Unidos*, pp 117-134. Produced by the Chile Initiative, OSU College of Forestry, Corvallis, Oregon USA; printed by Imprenta America, Valdivia, Chile.
- Manila R, Nelson R. 2013. Nutrient uptake and promotion of growth by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in tomato and their role in Bio-protection against the tomato wilt pathogen. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 3 (4): 42-46.
- Martínez DB, Barroetaveña C, Rajchenberg M. 2007. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque* 28(3): 226-233.
- Massone DS, Bartoli CG, Pastorino MJ. 2018. Efecto de la fertilización con distintas concentraciones de nitrógeno y potasio en el crecimiento de plantines de ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis*) en vivero. *Bosque* 39(3): 375-384.
- Pastorino M, Aparicio A, Azpilicueta MM. 2015. Regiones de Procedencia del Ciprés de la Cordillera y bases conceptuales para el manejo de sus recursos genéticos en Argentina. Ediciones INTA, ISBN 978-987-521-596-2. 115pp.
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected

to drought stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55(403), pp. 1743–1750.
DOI: 10.1093/jxb/erh188

Romero AE, Ryder J, Fisher JT, Mexal JG. 1986. Root system modification of container stock for arid land plantings. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. *Forest Ecology and Management*. 16: 281-290.

Salgado Salomón ME, Rajchenberg M, Barroetaveña C. 2009. Evaluación del estado micorrícico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. *Bosque* 30(3): 127-134.

Salas E, Blanco F. 2000. Selección de plantas hospederas y efecto del fosforo para la producción de Inoculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares por el método de cultivo en macetas. Universidad de Costa Rica San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 24(1): 19-28.

Singer R. 1969. *Mycoflora Australis*. J. Cramer. Stuttgart, Germany. 405 p.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Cambridge, U.K. 3th ed. Academic Press. 605 p.

Souto C, Gardner PM. 2013. *Austrocedrus chilensis*. Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T31359A2805519.en>

Veresoglou SD, Rillig MC. 2012. Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi. *Biol. Lett.* 8: 214–217.
DOI:10.1098/rsbl.2011.0874

Vierheilig H, Steinkellner S, Khaosaad T, García-Garrido JM. 2008. The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM symbiosis: One mechanism, two effects? En: Varma A (ed.) *Mycorrhiza*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 207-320

Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC. 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53(3): 197–201. DOI:10.1016/j.pedobi.2009.10.002