



ID 92: Colonización micorrícica de plantines de Ciprés de la Cordillera en relación a la disponibilidad de agua y fósforo en vivero

Massone DS^{1,2,*}; Martucci A¹; Askenazi Vera JE²; Pastorino MJ³; Bartoli C⁴

¹ Unidad de Propagación Vegetal - INBIES – Univ. Nac. de la Patagonia SJB - Sede Esquel; ²Facultad de Ingeniería Forestal – Univ. Nac. de la Patagonia SJB - Sede Esquel; ³ Unidad de Genética Ecológica y Mejoramiento Forestal - INTA EEA Bariloche; ⁴ Instituto de Fisiología Vegetal, Fac. Cs. Agrs. y Ftale., UNLP - CCT CONICET La Plata CONICET.

* diego-massone@hotmail.com.ar

Palabras claves: *Austrocedrus chilensis*, micorrizas arbusculares, inoculación espontánea

Introducción

El potencial de manipular la inoculación de las plantas con hongos micorrícicos para aumentar la productividad en plantaciones forestales o el establecimiento durante la restauración de ecosistemas ha sido y es foco de una gran cantidad de investigaciones (Brundrett et al. 1996). Los hongos micorrícicos forman asociaciones con las raíces de más del 90% de las plantas superiores, incluyendo árboles forestales, pastos silvestres y muchos cultivos (Bonfante y Genre 2010). Las raíces del Ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. et Bizzarri), se asocian naturalmente con hongos del suelo formando micorrizas del tipo arbusculares (MA) (Fontenla et al. 2001). En general el uso de fertirriego en los procesos de cultivo de plantines forestales, que conllevan altas dosis de nitrógeno y fósforo, usando medios de crecimiento artificiales provocan una disminución de la micorrización (Martínez et al. 2007). Por otro lado, 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. En base a lo mencionado, se plantearon como objetivos: (i) evaluar la influencia de distintas disponibilidades de fósforo y estados hídricos del sustrato en el nivel de colonización micorrícica durante la viverización, (ii) evaluar si se produce la colonización en vivero o si los plantines son micorrizados una vez que son llevados a campo. Se plantean como hipótesis que en plantines de Ciprés de la Cordillera obtenidos mediante métodos de viverización con altos niveles de fertilizante y condiciones hídricas adecuadas, la micorrización será inhibida. Por otra parte, se espera que los plantines carentes de inoculación exógena (sin empleo de inoculante de MA en ninguna de las etapas del cultivo), sean micorrizados de forma natural una vez llevados a campo, dado que las especies de hongos micorrícicos son cosmopolitas.

Materiales y métodos

Los plantines utilizados en este estudio se cultivaron a partir de semillas provenientes de árboles de la cabecera sur del Lago Futalaufquen (42°54'31,6" S – 71°36'41,8" W – 570 m snm), sembradas directamente en tubetes troncocónicos de 250 cm³, rellenos con un sustrato a partir de la mezcla de perlita y turba en relación 1:2. El método de viverización utilizado fue del tipo semi-controlado con manejo de fertirrigación, distinguiéndose tres fases de crecimiento (establecimiento, crecimiento rápido y rusticación) (Landis 1989). Las plantas se criaron por dos ciclos vegetativos. Los tratamientos consistieron en la combinación de tres niveles de concentración de fósforo (P) (1, 10 y 100 mg L⁻¹) y dos niveles de contenido hídrico del sustrato (H₂O) (20 % y 80 % del agua aprovechable (AA)), aplicados durante la fase de establecimiento. De la combinación de los niveles de los factores se generaron seis tratamientos: T 20-1, T 20-10, T 20-100, T 80-1, T 80-10 y T 80-100.



El análisis de colonización micorrícica se efectuó sobre tres lotes de plantines sometidos a procesos diferentes. A un primer lote de plantas (L1) se le efectuó la determinación de micorrizas inmediatamente después de finalizado su segundo ciclo de crecimiento en vivero. A las plantas de un segundo lote (L2) se las repicó a envases de nylon negro de 1000 cm³ una vez concluido su segundo ciclo vegetativo en vivero. Como sustrato para los envases se utilizó una mezcla formada por una proporción 1:1 de tierra y turba rubia, ambas esterilizadas. Las plantas envasadas se mantuvieron durante una temporada de crecimiento en invernadero (13 meses), interviniéndolas solamente con dos aplicaciones semanales de agua de perforación. Finalmente, un tercer lote de plantines (L3) fue llevado a campo a principios de la primavera. La plantación se realizó en el mes de septiembre, en un sitio méxico con bosque puro de Ciprés de la Cordillera (41° 52' 08" S, 71° 29' 15" W, 564 m s. n. m.). Las plantas de L2 y L3 fueron muestreadas en el mes de octubre del año siguiente. También se realizó un análisis de presencia de MA sobre el sustrato usado en vivero utilizando una adaptación de la técnica de extracción de esporas MA de muestra de suelo usada por Ianson y Allen (1986). Para la determinación del porcentaje de colonización de raíces por MA (%MA), los sistemas radicales de los plantines de todos los lotes a evaluar fueron lavados y teñidos, según la metodología utilizada por Cázares y Trappe (1993). El %MA se estimó mediante el método de intersección (Brundrett et al. 1996), expresado en la siguiente ecuación:

$$\%AM = (IM / IT) \times 100 \quad [1]$$

siendo %AM: porcentaje del sistema radical con MA; IM: intersecciones con raíz micorrizada; IT: intersecciones totales.

El conteo de la cantidad de intersecciones de cada sistema radical analizado 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. Sobre esta grilla se distribuyeron homogéneamente las muestras de raíces y se efectuaron los conteos de las intersecciones de las raíces con las líneas de la grilla, identificando como SÍ a las intersecciones con raíces micorrizadas (teñidas de azul) y como NO las intersecciones con raíces no micorrizadas (no teñidas). Las observaciones se realizaron con una lupa binocular estereoscópica 10X (Bausch & Lomb). De los casos SÍ se realizó una sub-muestra para verificar que la tinción efectivamente se debía a estructuras pertenecientes a las MA (i.e. vesículas, arbuscúlos, coils e hifas inter-intracelulares) (figura 1). Estas observaciones se realizaron con un microscopio óptico Leica DM500. Por último, la cantidad de intersecciones SÍ y la cantidad de intersecciones totales (SÍ + NO) se utilizaron en la ecuación 1.

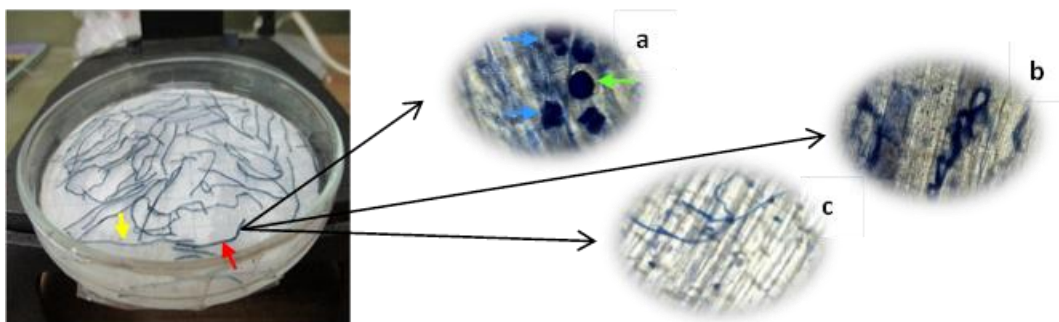


Figura 1. Imagen de la caja de Petri con la cuadrícula de fondo y las raíces distribuidas. La flecha roja señala la intersección considerada 'SI', y la flecha amarilla la intersección considerada 'NO'; estructuras observadas en microscopio: a) Vesículas (flecha verde) y arbuscúlos (flecha azul), b) coils y c) hifas inter-intercelulares.

Los ensayos de los lotes de plantas 1 y 2 se trabajaron con un diseño completamente aleatorizado (DCA), mientras que para el ensayo del lote 3 se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA). En los tres casos se trabajó con 8 réplicas por tratamiento y la unidad muestral la conformó



el plantín. Para comprobar el efecto de los tratamientos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA). Para la variable %MA, los porcentajes se transformaron a arco seno con el fin de cumplir el supuesto de normalidad de los datos. En los casos en que se encontraron diferencias entre los tratamientos se utilizó el test a posteriori de LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) con corrección de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico InfoStat/ Profesional, versión 2016.

Resultados

En los tres lotes de plantas (L1, L2 y L3) se comprobó presencia de MA al momento del análisis de %MA. La interacción de los factores concentración de P y H₂O no fue significativa ($P > 0,05$) para ninguno de los tres lotes analizados, sin evidenciarse interacciones entre los factores. El lote L1 (vivero) mostró un %MA general del 24 %. Este presentó diferencias significativas entre los niveles ensayados, tanto para el factor H₂O ($p < 0,0001$) como para el factor concentración de P ($p = 0,003$) (Fig. 2 a y b).

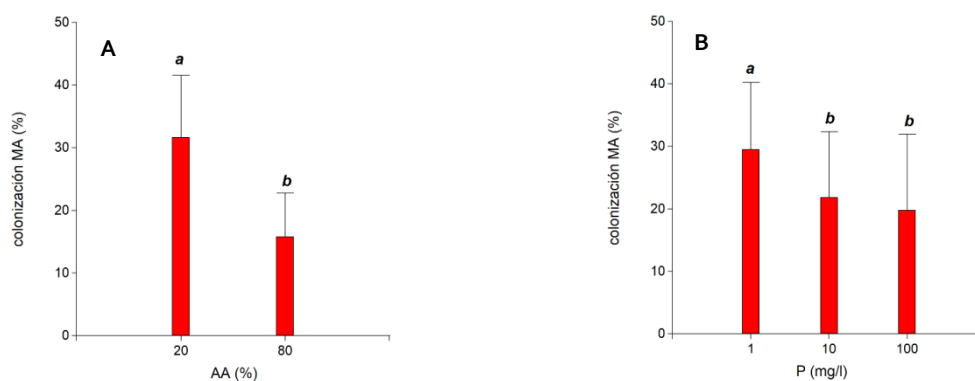


Figura 2. Porcentaje de colonización de micorrizas arbusculares (MA) de plantines de Ciprés de la Cordillera del lote (L1). A) En relación a los dos niveles de contenido hídrico (%AA). B) En relación a los tres niveles de concentración de fósforo (P). Los valores seguidos por la misma letra por tratamiento no presentan diferencias significativas (Fisher, $p < 0,05$).

El %MA del lote L2 (envase) fue del orden del 81 %. En tanto que el %MA del lote L3 (campo) fue del orden del 93 %, y sólo se comprobaron diferencias significativas entre los niveles del factor H₂O ($P < 0,0001$). Las plantas manejadas con el nivel de menor H₂O (20 %) presentaron los mayores %MA, mostrando porcentajes del 98 %, en tanto que las plantas tratadas con un H₂O mayor (80 %) exhibieron los menores porcentajes de MA (87 %). El factor fósforo mostró porcentajes del 92 %.

Discusión y conclusiones

A pesar de que los análisis realizados en el sustrato determinaron la ausencia de esporas de hongos formadores de MA, el análisis de %MA realizado al lote L1 dio como resultado presencia de MA. Este resultado evidencia que otras fuentes externas pudieron ser causales de la provisión de inóculo. El vivero donde se realizó el ensayo se encuentra en una zona donde, si bien no hay presencia de rodales de Ciprés de la Cordillera, sí están presentes otras plantas vasculares que se asocian con MA, pudiendo ser fuente de un aporte aéreo de esporas (Davinson et al. 2015). Por otro lado, la fuente de agua utilizada para el cultivo, se almacenaba en un tanque australiano, el que podría recibir inóculo del medio circundante. Por último, la semilla no fue esterilizada al momento de la siembra (Salgado Salomon et al. 2009). Al analizar el estado de %MA del lote L1 observamos que el mismo fue mayor en los tratamientos con menor H₂O (20 % de AA) y en los de menor disponibilidad de P (1 ppm). Estos resultados concuerdan con lo observado por otros autores (Smith y Smith 2011, Gosling et al. 2013). El análisis del L2 perdió sentido, debido a que, si bien se observó un efecto inhibitorio moderado del P y el H₂O del sustrato sobre el %MA, en todos los tratamientos el proceso de la simbiosis se produjo en el vivero. Por otro lado, las plantas del L3 presentaron un mayor %MA y una dinámica del %MA



diferente a la mostrada por las plantas del L₁, lo cual pudo haber estado relacionado con el hecho que al desaparecer todo tipo de manejo de fertilización y agua, el nivel de %MA se habría expresado en relación a las fuentes de inóculo que incidían en estos procesos. Estas fuentes serían las heredadas del vivero, del inóculo aéreo e inóculo presente en el suelo del lugar de plantación. En esta línea, Salgado Salomón et al. (2009) mencionan en su trabajo sobre el estado micorrícico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego sin manejo de la micorrización, que al comparar los porcentajes de micorrización total entre las plantas salidas de vivero (T₁) y las envasadas en suelo estéril (T₂), se observó un valor significativamente inferior en el T₁, señalando que la dieta de fertilizante aplicada en el vivero de producción acelerada estaría inhibiendo el proceso de formación de las micorrizas.

Según nuestros resultados, para plantines de Ciprés de la Cordillera, el proceso de colonización micorrícica se produce en el vivero aun sin la aplicación exógena de inoculante de MA. Dicha micorrización es parcialmente inhibida por el manejo de fertirrigación y agua llevado adelante durante la viverización. Por último, El %MA aumenta una vez que la planta es llevada a campo independientemente del %MA con que el plantín llega del vivero.

Bibliografía

- Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*. 1:48. DOI: 10.1038
- Brundrett M, Bougher N, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for International Agricultural Research, Monograph 32. Canberra, Australia. 374p.
- Cázares E, Trappe JM. 1993. Vesicular endophytes in roots of Pinaceae. *Mycorrhiza*. 2: 153-156.
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeya A, Ainsaar L, Bâ A, Zobel M. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*. 349: 970-973.
- Fontenla S, Bacalá N, Havrylenko M. 2001. Dinámica de las micorrizas arbusculares en dos bosques de *Austrocedrus chilensis* con diferente estado sanitario. *Ecología*. 15: 37-44.
- Gosling P, Mead A, Proctor M, Hammond JP, Bending GD. 2013. Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar response to a soil phosphorus concentration gradient. *New Phytol*. 198: 546–556.
- Ianson DC, Allen MF. 1986. The effects of soil texture on extraction of vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungal spores from arid sites. *Mycologia* 78(2): 164-168.
- Landis T, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP. 1989. 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.
- Martinez 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.
- 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.
- Smith SE, Smith FA. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 227–250.