

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**UTILIZACION DE ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO PARA EL
ENCAPSULAMIENTO DE INOCULOS MICORRICICOS ERICOIDES**

Tesis de grado presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

CONSUELO AYLIN MEDINA LIRA
TEMUCO – CHILE
2010

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**UTILIZACION DE ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO PARA EL
ENCAPSULAMIENTO DE INOCULOS MICORRICICOS ERICOIDES**

Tesis de grado presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

CONSUELO AYLIN MEDINA LIRA
PROFESOR GUIA: RUBÉN FERNANDO CARRILLO LÓPEZ
TEMUCO – CHILE
2010



Tesis financiada a través de INNOVA BIO-BIO - CORFO 06-IE-S1-106

Utilización de esferas de alginato de calcio para el encapsulamiento de inóculos micorrícicos ericoides.

PROFESOR GUÍA : Nota:

RUBEN CARRILLO LOPEZ.

Bachiller en Ciencias Biológicas
Magíster en Ciencias mención Botánica.
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales,
Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO : Nota:

MARCELO RODRIGUEZ BERAUD.

Ingeniero Agrónomo
Magíster en Ciencias mención Mejoramiento Vegetal.
Facultad de Recursos Naturales
Escuela de Agronomía
Universidad Católica de Temuco

CALIFICACION PROMEDIO TESIS :

A mi mamita querida...

AGRADECIMIENTOS

Luego de dar por finalizado este trabajo quisiera dar gracias a Dios, por haberme ayudado a cruzar cada obstáculo que debí afrontar en esta larga carrera.

Agradezco a mi madre Vitalia Lira Aguilera por estar siempre de manera incondicional y confiar en mis capacidades.

A mi tía Guillermina Lira Aguilera por abrirme las puertas de su hogar y acogerme sin reparo y con mucho cariño durante todos los años que necesité para terminar la carrera.

Deseo agradecer a mi tía Lidia Lira Aguilera por haber estado presente cada vez que necesité de su apoyo.

A mi profesor guía, Rubén Carrillo López por entregarme sin condiciones sus conocimientos cada vez fue necesario, agradezco su confianza, amistad y palabras de motivación.

A mi profesor consejero, Marcelo Rodríguez Beraud por su cooperación en el desarrollo de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
1.1	Hipótesis	3
1.2	Objetivo general	3
1.3	Objetivos específicos	3
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Antecedentes de la Familia <i>Ericaceae</i>	4
2.1.1	Antecedentes de <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	5
2.1.2	Antecedentes de <i>Gaultheria pumila</i> (L. fil) Hook	7
2.2	Micorrizas: Antecedentes generales.	8
2.2.1	Tipos de micorrizas	9
2.2.2	Micorrizas ericoides; Descripción	12
2.2.3	Desarrollo de la simbiosis endomicorrícica	14
2.2.4	Importancia de la micorrización	15
2.3	Tipos de transportadores utilizados para la inoculación con hongos micorrícicos	18
2.3.1	Métodos de aplicación de inóculos micorrícicos en vivero	19
2.3.1.1	Inoculación al sustrato de crecimiento	19
2.3.1.2	Inoculación al momento de realizar el trasplante	19
2.4	Factores que afectan la efectividad de los inoculantes	20
2.4.1	Planta	20
2.4.2	Micotrofia	20
2.4.3	Relación infectividad versus efectividad	21
2.4.4	Sustrato	21
2.4.5	Características químicas	22
2.4.6	Manejo en el vivero	22

2.4.7	Fertilización	22
2.4.8	Aplicación de plaguicidas	23
2.5	Utilización de esferas de alginato de calcio	23
2.5.1	Extracción de alginatos	23
2.5.2	Aplicaciones de microcapsulas de alginato en biotecnología	24
2.5.3	Viabilidad de células contenidas en esferas de alginato	26
3	MATERIALES Y METODOS	28
3.1	Lugar de realización del estudio	28
3.2	Materiales	29
3.2.1	Extracción del inóculo	29
3.2.2	Elaboración de esferas de alginato de calcio	30
3.2.3	Medición de la colonización micorrícica ericoide	31
3.2.4	Mediciones de parámetros morfométricos	32
3.3	Metodología	33
3.3.1	Obtención del inóculo contenido en raíces	33
3.3.2	Obtención del inóculo contenido en el suelo rizosférico	34
3.3.3	Preparación de la mezcla con alginato de sodio	35
3.3.4	Preparación de la mezcla con cloruro de calcio	36
3.3.5	Elaboración de las esferas	36
3.4	Plántulas de <i>Vaccinium corymbosum</i> var. O`Neal inoculadas con esferas de alginato de calcio	38
3.5	Diseño experimental	38
3.6	Evaluación de la colonización micorrícica ericoide	40
3.7	Medición de parámetros morfométricos	44

4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	46
4.1	Frecuencia e intensidad de colonización en plantas inoculadas y control de <i>Vaccinium corymbosum</i> var. O`Neal	46
4.2	Parametros morfológicos para plantas inoculadas y control de <i>Vaccinium corymbosum</i> var. O`Neal	48
4.2.1	Longitud de la Raíz	48
4.2.2	Longitud del tallo	49
4.2.3	Diámetro del cuello	51
4.3	Parámetros de peso seco para plantas inoculadas y control de <i>Vaccinium corymbosum</i> . Var. O`Neal	52
4.3.1	Peso seco de la raíz	52
4.3.2	Peso seco del tallo	54
4.4	Esferas de alginato de calcio, efectivo transportador de inóculo micorrícico ericoide	57
5	CONCLUSIONES	59
6	RESUMEN	61
7	SUMMARY	62
8	LITERATURA CITADA	63
9	ANEXOS	69

1 INTRODUCCION

La especie *Vaccinium corymbosum* L. o comúnmente llamado arándano, es un frutal originario de Norteamérica que llegó a Chile en la década los años ochenta. Pertenece a la familia *Ericaceae* y al género *Vaccinium*.

El consumo de esta baya es muy tradicional en los países del Hemisferio Norte, donde es valorada no sólo por su sabor, sino también por sus propiedades medicinales. Los arándanos son una rica fuente de vitamina C, estimulantes de las defensas naturales del organismo y además un potente antioxidante ya que tiene la capacidad de neutralizar aquellos radicales libres causantes del daño oxidativo de lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. Proceso que se encuentra asociado al desarrollo de enfermedades cancerígenas, cardiovasculares y neurodegenerativas. Sin embargo, la concentración de este compuesto antioxidante se ve influenciado por factores muy variados entre los que destacan la genética del cultivar, la madurez de cosecha, las características de la localidad y manejo del cultivo.

La importancia de esta especie en nuestro país radica en que debido a su rica geografía, diversidad climática y la producción en contra estación permite a Chile ser el principal exportador de arándanos del hemisferio sur, y a nivel mundial ocupa el tercer lugar, después de Estados Unidos y Canadá. Las superficies de arándanos en Chile se extienden desde la región de Coquimbo hasta la región de Aysén, con un total de 10.763 hectáreas, donde la mitad de esta superficie se encuentra en formación. Esta temporada la producción de este fruto registró una alza del 40%, según la Federación de Productores Frutícolas.

Un punto necesario para seguir bien posicionados en el mercado es invertir en capacitación e incorporación de nuevas tecnologías para mejorar la producción, y así lograr que estas exportaciones cumplan notablemente con las exigencias del mercado, con esto que el consumidor identifique el arándano chileno como un producto de primera calidad. Además se necesita potenciar aquellas características como país proveedor confiable de fruta fresca de alta calidad, libre de plagas y enfermedades. Para ello es necesario mejorar la cadena productiva

desde el viverista al exportador, puesto que, si desde el vivero se logran plantas con alto potencial productivo resistentes a soportar condiciones extremas con condiciones fitosanitarias incomparables, será posible extender el área de cultivo, llegando así a establecer huertos en lugares donde antes se pensaba imposible.

Por otra parte, la producción de alimentos sanos obtenidos sin la utilización desmesurada de agroquímicos y fertilizantes, es un punto clave, cada día exigido y más valorado por los países importadores. Como una alternativa a ello es la incorporación y utilización de productos denominados biofertilizantes, estos corresponden a uno o varios microorganismos del suelo y pueden ser aplicados a la semilla o directamente al suelo con el fin de incrementar su población para facilitar la asociación directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favoreciendo su interacción e incrementando el desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta huésped. Otra característica de los biofertilizantes es ser un producto inocuo tanto para el hombre como para el ambiente.

La especie *Vaccinium corymbosum* presenta una asociación particular y específica a nivel radical con un tipo de hongo simbiote, la cual se denomina micorriza ericoide. La utilización de este tipo de hongos como biofertilizantes es una opción viable y con gran potencial en la industria frutícola. La micorriza corresponde a una estructura especializada que se forma por la asociación de un grupo específico de hongos con las raíces de las plantas y cuya función repercute en beneficios nutrimentales y fisiológicos para ambos organismos.

Se estima que contando desde la etapa de vivero con una fuente permanente de inóculos de hongos micorrícicos se genera un incremento en el desarrollo de las plantas, una mejora de la producción de fruta, y a la vez se evita la aplicación excesiva de agroquímicos como fertilizantes y plaguicidas, y además permite una mayor adaptabilidad a las nuevas áreas de cultivo. Es así como en Chile se hace necesario promover la innovación de métodos efectivos para la propagación y transporte de inóculos micorrícicos del tipo ericoide, los cuales deben cumplir con ciertas características como por ejemplo ser un método eficiente, amigable con el medio ambiente, que sea fácil de manipular y transportar y, que permita además hacer un uso eficiente del inóculo a utilizar.

El innovar hoy es tener mejores cosechas mañana, por ello los objetivos de esta investigación son:

Objetivo general

Evaluar esferas de alginato de calcio como transportador de propágulos micorrícicos ericoides, que permitan mejorar el manejo e inoculación en plantas de arándano.

Objetivos específicos.

- ✓ Generar esferas de alginato de calcio con distintas densidades, que permitan una adecuada manipulación, transporte y durabilidad del inóculo.
- ✓ Desarrollar inoculaciones micorrícicas con la utilización de esferas de alginato de calcio.
- ✓ Determinar la frecuencia e intensidad de colonización micorrícica ericoide a nivel radical de *Vaccinium corymbosum* inoculadas mediante la utilización de esferas de alginato de calcio como transportador de inóculo.
- ✓ Evaluar parámetros morfométricos en plantas de *Vaccinium corymbosum* inoculadas mediante la utilización de esferas de alginato de calcio como transportador de inóculo.

Hipótesis.

H₀: Las esferas de alginato de calcio no corresponden a un efectivo transportador de inóculos micorrícicos ericoides.

H₁: Las esferas de alginato de calcio corresponden a un efectivo transportador de inóculos micorrícicos ericoides.

2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes de la familia *Ericaceae*.

Las plantas de la familia *Ericaceae* presentan una amplia distribución geográfica; están presentes en todos los continentes desde las zonas templadas a frías, con excepción de la Antártica, hasta las regiones montañosas neotropicales donde alcanzan su mayor diversidad. Estas constituyen una familia muy diversa, con cerca de 125 géneros y aproximadamente 4.500 especies (Kron *et al.*, 2002; Luteyn, 2002).

Esta familia es uno de los componentes florísticos más sobresalientes del neotrópico, con cerca de 45 géneros y 800 especies (Luteyn, 2002). Las zonas montañosas del noroccidente de Sudamérica, especialmente la vertiente pacífica de los Andes, son las más diversas en este grupo de plantas (Salinas y Betancur, 2007).

En cuanto a los requerimientos edafoclimáticos estos son muy particulares, ya que prefieren los suelos ácidos, con mucha aireación, buen drenaje, pero que tengan un adecuado abastecimiento de agua durante la temporada de crecimiento. La mayoría de las especies requiere de suelos con pH 4,0 a 5,2, liviano, con textura limosa a franco arenosa y abundante materia orgánica (Buzeta, 1997).

La ausencia de pelos radicales es una de las características más notables que posee ésta familia de plantas, por lo cual la absorción de agua y nutrientes la desarrollan raicillas de menos de 100 μm de diámetro, otra particularidad es que la absorción de nitrógeno como nitrato puede generar toxicidad debido a una deficiencia en el funcionamiento de la enzima nitrato reductasa (Read, 1996).

La evolución de esta familia les ha conferido una condición de plantas calcífugas, que fácilmente se intoxican con el calcio disponible en el suelo o agua de riego, si este elemento esencial se encuentra en una concentración mayor a su rango de tolerancia (Vega y Gárciga, 2007).

Por otra parte, la literatura presenta abundante evidencia de que las plantas de la familia *Ericaceae* poseen una tendencia a la micorrización (Straker, 1996; Vega y Gárciga, 2007), habilitando a este tipo de plantas para colonizar hábitats extremadamente deficientes en nutrimentos minerales (y/o ambientes climáticamente adversos y que, en ciertas condiciones, constituye una estrategia esencial para la sobrevivencia de la planta (Dixon, 2002). Este tipo de micorrización corresponde a aquella que lleva por nombre ericoide, aunque algunas especies de esta misma familia también pueden presentar micorrizas de tipo arbutoide y monotrofoide (Lopez y Fierro, 2002). Es por ello y debido a su ecología que estas plantas se encuentran con frecuencia como especies pioneras en sustratos volcánicos y de preferencia en deslizamientos de tierra y lava. Es así como algunas especies del género *Gaultheria* forman verdaderas alfombras o tapetes vegetales, lo que responde a su hábito de crecimiento de tipo rastrero (Luteyn, 1995).

2.1.1 Antecedentes de *Vaccinium corymbosum* L.

Vaccinium corymbosum L. comúnmente llamado “arándano” es un frutal menor nativo de Norteamérica, pertenece al orden *Ericales*, familia *Ericaceae*, subfamilia *Vaccinioideae*, género *Vaccinium*, subgénero *Cynacoccus* y forma parte del grupo de los berries (Pritts y Hancock, 1992). El género *Vaccinium* es uno de los más diversos de la familia *Ericaceae*, abarcando cerca de 450 especies que se distribuyen principalmente en el hemisferio norte (Salinas y Betancur, 2007).

El arándano corresponde a un arbusto erecto, siempreverde, que dependiendo de la especie, puede alcanzar alturas desde unos pocos centímetros hasta 5 metros, y los tallos pueden tener una actividad productiva de 3 a 4 metros (Lobos, 1990).

Las hojas son simples, se distribuyen en forma alterna en la ramilla, varían entre uno a ocho cm en el largo y la forma puede ir de ovada a lanceolada. Tienen color verde pálido y en otoño desarrollan una pigmentación rojiza. Hay estomas solamente en el envés de las hojas encontrándose en densidades de 300 por mm cuadrado (Buzeta, 1997).

La flor del arándano está compuesta por un ovario unido al cáliz; tiene entre cuatro a cinco celdas con uno o más óvulos en cada lóculo; el pistilo consiste en un tubo filiforme que termina en un estigma pequeño no modificado. La flor tiene entre ocho a 10 estambres insertos en la base de la corola. Florece generalmente en racimos axilares, pero también se pueden dar en forma terminal (Buzeta, 1997).

El fruto es una baya casi esférica, que dependiendo de la especie y el cultivar puede variar en tamaño de 0,7-1,5 cm de diámetro, con un notable y característico color azul metálico. Contiene 5 lóculos que son delineados por una pared de células simple, lo que constituye el endocarpio. Las semillas perfectas tienden a agruparse en la parte superior del eje del lóculo, con las semillas imperfectas las cuales ocupan la porción basal de este, se sugiere además que el número de tubos polínicos puede ser insuficiente para fertilizar todos los óvulos (Eck, 1986).

El sistema radical del arándano es superficial, fibroso, de poca extensión y se compone de finas raicillas. Debido a que la raíz está desprovista de pelos radicales, son las raíces jóvenes las que efectúan la labor de absorción. Esta situación genera una capacidad de absorción mucho menor comparado con otras especies (Buzeta, 1997). Las células de la epidermis de éstas, se encuentran asociadas bajo condiciones naturales a hongos simbiotes, pertenecientes a las micorrizas ericoides, las cuales intervienen en el metabolismo del N y el P (Buzeta, 1997).

En Chile se produce la mayoría de las variedades de arándano que se comercializan en el mercado mundial, las cuales se distinguen por aquellas que poseen un alto requerimiento de frío invernal, entre estas se encuentran las variedades Bluecrop, Blueray, Elliot, Briggita, Toro y Duke, por otra parte se encuentran aquellas que poseen un bajo requerimiento de frío invernal, las variedades corresponden a O'Neal, Misty, Sharpblue, Cape Fear, Jewel, Biloxi, Jubilee (Muñoz y Moreira, 2002).

2.1.2 Antecedentes de *Gaultheria pumila* (L.f.) D.J.Middleton.

Gaultheria pumila o comúnmente conocida como “Chaura” pertenece a la familia *Ericaceae* y al género *Gaultheria*, con alrededor de 115 especies de arbustos y subarbustos, se encuentra muy extendido en las regiones templadas y tropicales. Se presenta tanto en los hemisferios Norte y Sur, en el Antiguo y el Nuevo Mundo. Aproximadamente 43 especies se encuentran en América Latina, entre ellas siete son endémicas de Brasil, 6 endémicas de la zona de clima templado de Argentina y Chile, y 30 endémicas de la región tropical de montaña que va desde México hasta el norte de Argentina (Luteyn, 2002).

Gaultheria pumila es una especie que crece habitualmente en los sectores andinos desde los 400 hasta los 2500 m.s.n.m. entre Santiago y Magallanes. Es considerada como una especie frecuente tanto en Chile como en Argentina (Hoffmann, 1991).

En cuanto a su botánica, este es un arbusto bajo, de ramas tendidas, que a menudo crece en formas acojinadas. Tiene hojas simples, alternas, coriáceas, de 3 a 7 mm de largo, con el borde entero o finamente dentado y el ápice un tanto agudo. Sus flores son axilares de 3 a 5 mm., solitarias y pedunculadas. Presenta un cáliz de 5 divisiones, corola acampanada, globosa con 5 lóbulos doblados hacia fuera y 10 estambres. Posee un estilo largo y un estigma capitado. Su floración comienza en diciembre y finaliza en el mes de marzo (Hoffmann, 1991). Su fruto comestible, es una baya globosa de 5 a 10 mm de diámetro, de color blanco a rosado con numerosas semillas, posee además un intenso aroma y agradable sabor (Sleumer, 1999).

Esta especie presenta distribución natural en Chile y se caracteriza por la capacidad de establecer una simbiosis a nivel radical denominada micorriza ericoide, lo cual se evidencia por la presencia de enrollamientos hifales en las células corticales de la raíz (Medina, 2009).

Medina, 2009 afirma que *Gaultheria pumila*, independientemente del lugar de colecta, presenta altos niveles de colonización. Además afirma encontrar un mayor número de esporas de hongos micorrícicos en la rizosfera de las plantas de esta especie.

2.2 Micorrizas: Antecedentes generales.

Existe una región del suelo definida como rizósfera donde se generan numerosas interacciones entre las raíces de la planta y los microorganismos del suelo, especialmente bacterias y hongos. Muy probablemente, de todas las interacciones entre plantas y microorganismos, la de mayor proyección nutricional es aquella que se presenta entre las raíces y los hongos del suelo, en forma de mutualismo que se conoce como micorriza. A diferencia de lo que sucede con la fijación biológica de nitrógeno, donde sólo unas pocas familias, principalmente leguminosas, presentan la asociación simbiótica, se ha observado micorrizas en más del 80% de las especies estudiadas, incluyendo prácticamente todas las plantas de interés agrícola y forestal (Azcon-Bieto y Talon, 2000).

Las micorrizas son asociaciones mutualistas, altamente evolucionadas, entre los hongos del suelo y las raíces de las plantas. Los organismos que participan en esta asociación son miembros del reino Fungi (Basidiomycetes, Ascomycetes, Zygomycetes) y la mayoría de las raíces de las plantas. (Harley & Smith, 1983; García *et al.*, 2002). La simbiosis micorrícica esta restringida solo a los tejidos de la epidermis y corteza de raíces en crecimiento primario.

Desde el punto de vista evolutivo, se ha llegado a la conclusión de que los vegetales para colonizar las tierras emergidas hace unos 600 millones de años atrás, necesariamente debieron recurrir a la simbiosis mutualista con hongos micorrizógenos, dado que la posibilidad de nutrientes y agua era mucho menor que para el caso de las plantas acuáticas, ancestros de las primeras plantas terrestres y que, al parecer, no tenían las habilidades para obtenerlos en la cantidad adecuada (Selosse y Le Tacon, 1998). Al igual que las plantas, los hongos micorrizógenos han evolucionado adaptándose a ambientes específicos, donde expresan en mayor grado sus características de simbiosis, sin embargo, existen excepciones, donde el hongo puede adaptarse a una gran gama de ambientes edafoclimáticos (Selosse y Le Tacon, 1998).

Se debe tener presente que el desarrollo y actividad de los hongos micorrícicos puede verse afectado por diversos factores del sitio, y que además cada especie fúngica (cepa o ecotipo) tiene sus propias limitaciones ecológicas, existiendo por ello algunos más benéficos que otros en determinadas condiciones ambientales. Por ello la adecuada selección de las especies de hongos micorrícicos como simbioses y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de muchas especies vegetales en campo (Honrubia *et al.*, 1992; Marx *et al.*, 1994).

Un factor importante del cual depende la presencia de micorrización corresponde al pH edáfico, esto debido a que si se encuentra fuera del rango de adaptación del hongo, se pueden afectar en forma negativa la distribución desarrollo y función de muchas taxas de este tipo de hongos. Dos son los efectos principales de un pH fuera de rango sobre el hongo micorrizógeno: uno sobre la germinación de sus esporas debido a una mayor o menor solubilidad de elementos esenciales y toxinas, y otro sobre el funcionamiento de los procesos fungales relacionados con la absorción de nutrientes minerales esenciales (Straker, 1996).

2.2.1 Tipos de micorrizas.

En la naturaleza existen seis tipos bien diferenciados de micorriza y su distribución está influenciada por aspectos ecológicos relacionados con el clima, disponibilidad nutrimental y especificidad hacia algunas familias de plantas (Alarcón *et al.*, 2001).

Sin embargo otros autores afirman que se reconocen siete tipos de asociaciones micorrícicas, en las cuales participan diferentes grupos de hongos y plantas, y distintos modelos morfofisiológicos. Estos son: micorriza arbuscular (MA), ectomicorriza (EC), micorriza ericoide (ER), micorriza arbutoide (AR), micorriza monotrofoide (MN), ectendomicorriza (EE) y micorriza orquideoide (OR) (Brundrett *et al.*, 1996).

Cuadro 1. Tipos de Micorrizas y sus características.

Tipo	Estructura característica	Tipo de hongo	Planta hospedera (general)
Ectomicorriza	Manto de hifas rodeando la raíz; red de Hartig (Hifas conectadas de crecimiento intracelular en el interior de la corteza radical)	Basidiomycetes, Ascomycetes y Ficomicetes.	Arboles, arbustos de gimnospermas y angiospermas.
Ectendomicorriza	Puede existir manto aunque no necesariamente; red de Hartig; espirales de hifas en las celulas de la raíz.	Basidiomycetes y Ascomycetes	Arboles, arbustos de gimnospermas y angiospermas.
Micorriza Arbutoide (Endomicorriza)	Manto; red de Hartig; espirales de hifas en las celulas de la raíz.	Basidiomycete	Solo Ericales
Micorriza Monotropoide (Endomicorriza)	Manto hifal; red de Hartig; haustorio sin ramificar; micelio descolorido.	Basidiomycete	Solo Monotropaceas
Micorriza Ericoide (Endomicorriza)	Sin manto ni red de Hartig; espirales de hifas en la celula de la raíz.	Ascomycetes (Basidiomycetes en algunos casos)	Solo Ericales
Micorriza orquidioide (endomicorriza)	Sin manto ni red de Hartig; espirales de hifas en las celulas de la raíz; haustorio sin ramificar; micelio descolorido.	Basidiomycetes	Solo Orquidaceas
Micorrizas arbusculares (endomicorriza)	Sin manto ni red de Hartig; espirales de hifas en las celulas; haustorio ramificado en su extremo (arbsculo).	Zigomycetes	árboles, arbustos, gramíneas y plantas herbaceas; plantas inferiores (algas y helechos).

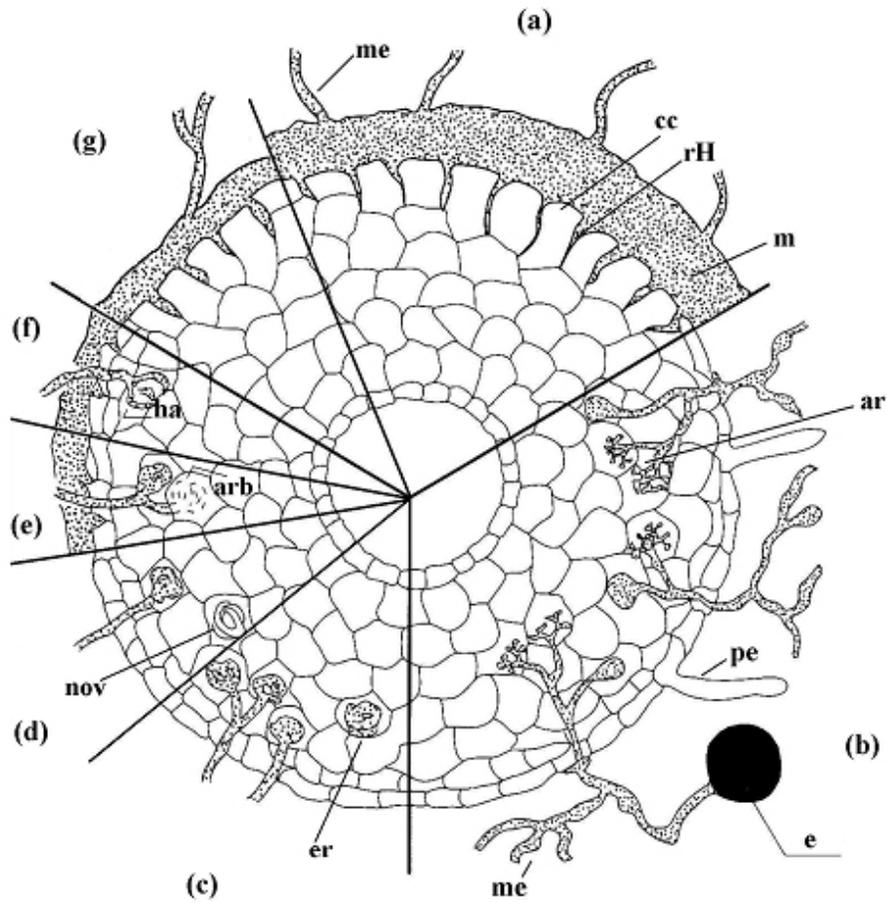


Figura 1. Tipos de micorrizas, modificado por Deacon 1997.

Ectomicorrizas (ECM)(a), micorrizas arbusculares (AM)(b), micorrizas ericoides (c), micorrizas orquídioides (d), micorrizas arbutóides (e), micorrizas monotropoides (f), arbuscula (ar), arbutóide (ARB), célula cortical (cc), espóra (e), enrollamiento (er), haustorios (ha), manto fúngico (m), micelio extrarradicular (me), bolas (nov) y red de Hartig (rH).

2.2.2 Micorrizas ericoides; Descripción.

Clásicamente las micorrizas ericoides se describen como la asociación que se efectúa entre un hongo y la raíz de una planta perteneciente a las tribus Epacridaceae, Ericeae y Stypheliodeae de la familia *Ericaceae* (Kron *et al.*, 2002).

En cuanto a los micobiontes que participan en esta simbiosis han sido agrupados al menos en dos clados de Ascomycetes: Los Leontiomycetes, mayormente representados por especies del género *Hymenoscyphus*, y los Hypromycetes, representados por el género *Oidiodendron* y sus teleomorfos *Myxotrichum* y *Byssoascus* (Beyoda, 2005).

Entre los hongos que forman micorrizas Ericoides y sus fitobiontes de la familia *Ericaceae* hay una coevolución difusa que varía en su intensidad en diferentes clados (Beyoda, 2005). Este tipo de micorriza posee estructuras fungosas intracelulares en las raíces que, por lo general, presentaban 1 a 4 capas celulares hacia el exterior del cilindro vascular. Dichas estructuras se originan a partir de hifas intercelulares de aproximadamente 2µm de diámetro y corresponden a una extensa proliferación de hifas dentro de la célula, las que pueden llegar a ocupar, prácticamente, todo el lumen de este (Vega y Muñoz, 1994). Cabe destacar que este tipo de micorriza puede degradar quitina y hexosaminas como importante fuente de nitrógeno (Kerley & Read, 1995).

Perotto *et al.* (1997), muestra cómo el hongo de micorriza ericoide puede ser biotrofo y saprotrofo a la vez, debido a la regulación diferencial de la expresión de genes que codifican para enzimas en el micelio interno y externo. Por esta razón, el hongo puede contribuir a la nutrición de la planta ejerciendo su acción en el suelo, y a la vez, puede evitar la respuesta de defensa de la planta cuando el hongo penetra raíz.

En Chile se han realizado algunas investigaciones sobre micorrizas ericoides, las cuales aportan información que permitiría inferir diferencias en la efectividad de los hongos micorrizógenos de acuerdo a sus suelos de origen (Vega y Gárciga, 2007).

Los hongos micorrícicos ericoides poseen una distribución global, sin embargo estos son específicos para cierto tipo de suelos. Algunos de estos corresponden a aquellos en que prosperan la mayoría de los ancestros de los arándanos cultivados, los cuales se caracterizan por poseer pH ácido (4.5-5.0), un alto contenido de materia orgánica vegetal no degradada (turba), bajos contenidos de nitrógeno mineral y alto en nitrógeno orgánico en la forma de proteínas y aminoácidos, bajo contenidos de la mayoría de los elementos minerales esenciales, especialmente calcio (Vega y Gárciga, 2007).

Cuadro 2. Características de la micorrización ericoide y las especies en las cuales se ha constatado su presencia.

Tipo de micorriza	Estructuras características	Planta huésped (Familia)	Especie	Tipo de hongo
Ericoide	Colonización intracelular. Sin Manto ni red de Hartig. Masas compactas de hifas (ovillos) en las células de la raíz.	<i>Ericaceae</i> (especies con distribución en Chile) <i>Epacridaceae</i> <i>Empetraceae</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i> <i>Vaccinium ashei</i> <i>Vaccinium angustifolium</i> <i>Gaultheria phillyreifolia</i> <i>Gaultheria sp.</i> <i>Gaultheria minima</i> <i>Gaultheria mucronata</i> <i>Gaultheria pumila</i> <i>Gaultheria linearifolia</i> <i>Rhododendron sp.</i>	<i>Ascomycetes</i> y <i>Basidiomycetes</i>

Fuente: (Carrillo, 1992; Godoy, 1994; Brundrett *et al.*, 1996)

2.2.3 Desarrollo de la simbiosis endomicorrícica.

La colonización del hongo micorrícico se inicia con la formación de una red poco compacta de hifas en la superficie de la raíz, luego penetra a través de las paredes celulares y de esta manera produce la formación un apresorio, este corresponde a una estructura de infección que puede ser desencadenados por presión física con las células epidérmicas de la raíz, esto en ausencia de señales adicionales. Durante la formación del apresorio, pero anterior a los primeros signos de la penetración, la célula epidérmica subyacente responde con una sorprendente reorganización celular. En primer lugar, el núcleo migra rápidamente a una posición justo por debajo del apresorio, luego se aleja dejando atrás de si una agregación de microtúbulos, microfilamentos de actina y cisternas del retículo endoplasmático. Esta agregación se organiza en una estructura con forma de dedo que se desarrolla previo a la penetración, la cual se proyecta en el lumen celular, esta estructura es la encargada de presagiar la trayectoria que debe seguir la hifa fúngica invasora (Reinhardt, 2007).

La creación de la simbiosis micorrízica implica adaptaciones específicas de desarrollo en la pareja simbiótica y la coordinación de señales específicas en este desarrollo. Las plantas producen una señal temprana para dar inicio a la interacción, mientras que el hongo produce al menos tres señales, una señal temprana difusible, una señal posterior local que permite a la planta detectar la posición de los apresorios, y más tarde, una célula autónoma da la señal en las células colonizadas que induce la expresión génica (Reinhardt, 2007). La identidad de estas señales, y la regulación molecular de la simbiosis programada en el hongo, están todavía por dilucidar. Sin embargo por el lado de la planta, los avances más importantes han sido realizados con la reciente identificación de la señal inicial, strigolactona, y con la caracterización genética y anatómica de partes del programa simbiótico. No obstante, muchos componentes que intervienen en la señalización entre los simbioses y en el establecimiento de los requisitos funcionales de la simbiosis aún están por identificar (Reinhardt, 2007).

El grado de colonización del sistema radical es afectado por factores externos que le imprimen una variación estacional, que depende en parte de la formación y crecimiento de nuevas raíces. De éste modo, a principios de primavera la colonización es reducida, incrementándose hacia el final del periodo de crecimiento de la planta. En invierno, se ha observado la presencia de hifas vivas dentro de las células huésped o en células vacías, aunque esto depende más de la condición de perenne o caducifolia de la planta huésped (Bonfante-Fasolo, 1981).

2.2.4 Importancia de la micorrización.

En ecosistemas poco intervenidos, este tipo de simbiosis es de importancia adaptativa para ambos organismos. Para la planta, la simbiosis le permite prosperar en ecosistemas que poseen uno o más factores edafoclimáticos limitantes y/o cuando las plantas poseen cierta inhabilidad para obtener recursos del medio, especialmente nutrientes y agua (Vega y Gárciga, 2007). Esta relación mutualista es capaz de disminuir el nivel de estrés asociado a la planta, permitiendo a esta mantener o aumentar su capacidad de competencia (Brundrett, 2004). En cuanto al hongo micorrizógeno, este es un organismo no fotosintético, que recibe azúcares (fotosintatos), desde la planta huésped. La cantidad de fotosintatos que debe dedicar la planta a la simbiosis usualmente se incrementa en la medida que el ambiente edafoclimático sea más limitante para ella (Vega y Gárciga, 2007).

En condiciones edafoclimáticas marginales, la planta tendrá un grado de dependencia de la simbiosis de acuerdo con sus necesidades no satisfechas y el grado de complementariedad genética con el hongo micorrizógeno. En ciertos casos, la planta puede ser altamente dependiente de la simbiosis micorrízica, al punto que la requiera para su sobrevivencia y/o completar su ciclo vital (Selosse y Le Tacon, 1998).

La colonización por micorrizas puede proteger las raíces de la planta de patógenos del suelo, incrementar el crecimiento de las raíces y la toma de los nutrientes por las raíces hospedantes. El mayor efecto sobre la nutrición es el resultado del transporte de la hifa de iones minerales poco o nada móviles. Las hifas crecen más allá de la rizófora del suelo incrementando

la superficie absorbente de las raíces. La actividad del micelio resulta en un incremento de la eficiencia en la absorción de nutrientes. Este proceso es particularmente importante para la difusión lenta de iones minerales tales como el fósforo (Read, 1996). Otro beneficio reside en que la resistencia al Cobre, Zinc y Aluminio, permite a la planta poder colonizar suelos derivados de residuos de la minería proporcionando una gran ventaja ecológica a la planta micorrizada (Read, 1996). El mecanismo de esta tolerancia está ubicado a nivel radicular, ya que se sugiere que la matriz interfacial de la simbiosis proporciona abundantes sitios de adsorción para iones di y trivalentes, en cambio para otros, incrementa la permeabilidad (Read, 1996).

El proceso de micorrización actúa como acelerador del crecimiento, por lo que se pueden obtener plantas con mayor vigor y sanidad. Esto se debe a que el proceso de micorrización puede modificar el balance de enzimas reguladoras, situación que ocurre con las auxinas, las citocininas, las giberelinas y el ácido abscísico, con lo cual se favorece el tamaño y el vigor de las plantas colonizadas (Gianinazzi, 1991).

Esta simbiosis igualmente presenta beneficios ecosistémicos, ya que las hifas del suelo tienen un importante rol en el ciclaje de nutrientes al cooperar con otros organismos en la descomposición de la materia orgánica del suelo, logrando reducir la pérdida de estos desde el ecosistema. Adicionalmente la simbiosis produce una mayor estabilidad de los agregados del suelo ya sea, por acción física, mediante la unión de partículas por las redes de hifas, como por la acción directa de la glomalina, una glicoproteína producida exclusivamente por hongos simbioses arbusculares (Borie *et al.*, 2006), la cual actúa como cementante de partículas. Los hongos micorrícicos contribuyen en el almacenamiento de carbono en el suelo por la alteración de la cantidad y calidad de la materia orgánica (Brundrett *et al.*, 1996).

Cuando las plántulas se trasladan desde el vivero al lugar de establecimiento, frecuentemente no presentan micorrización; por otro lado, la introducción de especies vegetales a nuevos hábitats, puede presentar problemas de establecimiento debido a la carencia del simbionte en el lugar; en ambos casos la utilización de un inoculante puede resultar beneficioso (Mikola, 1973).

Se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra que la inoculación artificial, con hongos micorrícicos a especies de interés agrícola y forestal, incrementa la nutrición y el crecimiento de la planta, aumenta la defensa contra patógenos y le permite a su vez superar situaciones de estrés biótico y abiótico (Núñez, 2003). La micorrización temprana de las plantas puede ser también interesante en situaciones en que la cantidad de inóculo en el suelo agrícola sea muy baja o por la existencia de un cultivo anterior no hospedador, y/o donde las poblaciones autóctonas no sean lo suficientemente agresivas y eficaces (Lemoine *et al.*, 1992). De esta manera que la actividad de incorporar hongos simbioses a nivel radical en viveros, tiene sentido en dos casos: primero, cuando en el lugar de la plantación no existe inóculo en forma natural y segundo, a pesar de estar presentes en el sitio de plantación, estos se encuentran en cantidades mínimas (Pritchett, 1991). En el primer caso resulta extremadamente importante la necesidad de inocular artificialmente, ya que de otra manera no prosperaría la plantación. En el segundo caso, se disminuye el tiempo de inoculación evitando que las plantas pierdan vigor una vez trasplantadas, lo cual implicaría una pérdida de crecimiento y una mayor predisposición al ataque de agentes patógenos (Branzanti *et al.*, 1999).

En la actualidad, existen en el mercado inóculos comerciales de hongos micorrícicos ericoides a disposición de los agricultores chilenos, sin embargo, estos han sido desarrollados en el hemisferio norte en ecosistemas muy diferentes a los ecosistemas mediterráneos de Chile. Bajo estas condiciones, tales inóculos no logran el rendimiento que estos ofrecen en la etiqueta (Vega *et al.*, 2009).

En ensayos realizados, al inocular arándano ojo de conejo (*Vaccinium ashei* Reade) en condiciones de invernadero, se encontraron hongos micorrizógenos nativos, tanto arbusculares como ericoides, lo cuales permitieron un mayor crecimiento vegetativo de las plantas que ensayos realizados con el hongo *Hymenosyphus ericae*, el cual corresponde a un simbionte fúngico aislado de arándanos del Hemisferio Norte y de amplia distribución en suelos ácidos. Por ello, según Vega *et al.*, (2009) afirman que desde el punto de vista teórico, la micorrización artificial de los arándanos debería estar basada en hongos que demuestren la mayor eficiencia

como simbioses bajo las condiciones edafoclimáticas locales, vale decir, que aporten el máximo de nutrientes y otros factores de crecimiento a cambio de la menor cantidad de fotosintatos.

Según Vega (1994), los principales factores que inciden en el grado de micorrización en las ericáceas son el tipo de hongo, y su eficiencia en el aporte de nutrientes en relación al consumo de fotosintatos provenientes del hospedante; el cultivar; la edad de la planta; el contenido de fósforo, el pH y la porosidad del suelo; la fertilización y las aplicaciones de fungicidas, entre otros.

2.3 Tipos de transportadores utilizados para la inoculación de hongos micorrícicos.

En el caso de los hongos micorrícicos el inoculante puede consistir de esporas, hifas, fragmentos de cuerpos fructíferos, raíces colonizadas y suelo rizosférico donde se detecte una abundancia de hifas de hongos micorrícicos provenientes de un sistema de raíz sano (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999). Como inoculante debe entenderse aquel producto biológico que facilita la introducción de microorganismos con diversa actividad fisiológica que favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este inoculante puede presentar diferentes aspectos físicos, ya sea líquidos o sólidos en los que se utilizan acarreadores como la turba, el carbón activado, aceites, alginatos y otros soportes orgánicos e inorgánicos. De este modo, el inoculante puede ser manejado con el fin de establecer los microorganismos en las hojas, tallo o raíces para establecerlos en los diversos sistemas de producción agrícola, hortícola, frutícola y forestal (Roumeau, 2001).

Rodríguez, (2007), logra inocular plantas de arándano micropropagadas y propagadas por estaca a nivel de vivero, para ello utilizó tres tipos de inóculos, el primer inóculo utilizado fue uno distribuido en Chile que se identifica comercialmente como MYCOSYM TRI-TON, el segundo corresponde a un tipo de inóculo de micorrizas vesículo arbusculares nativas, aisladas de muestras de suelo de la V región de Chile, y la tercera fuente de inóculo fue la utilizada popularmente en el campo, la cual consistió en obtener suelo desde la rizósfera de una plantación adulta de arándano para posteriormente inocular las plantas nuevas. Al concluir este estudio afirma que cuando se inoculan plantas de arándano con suelo rizosférico micropropagadas y propagadas por estaca se logra una mayor micorrización.

Métodos de aplicación de inóculos micorrícicos en vivero.

2.3.1.1 Inoculación al sustrato de crecimiento. Este método representa facilidad de manejo para el viverista. Sin embargo, se debe de cuidar la proporción inóculo – sustrato y que al menos debe de ser de un 50%, esto es fácil lograrlo cuando se emplean esporas de los hongos del grupo de los gasteromicetos (como *P. tinctorius*). Las proporciones de inóculo deben de mantenerse y vigilarse ya que este tipo de aplicación al romperse las proporciones se expresaría como baja micorrización o ausencia. Es importante mencionar que en el caso de los hongos endomicorrícicos es difícil lograr grandes volúmenes de inóculo conteniendo un número adecuado de esporas y que un inóculo compuesto por pedazos de raíces, hifas y esporas es el más recomendable. (Alarcón, 2001).

2.3.1.2 Inoculación al momento de realizar el trasplante. Sin duda, este es el método más recomendado para aplicar los hongos micorrícicos ya que la aplicación directa del inoculante en el sustrato, en el agujero donde se establecerán las plántulas y sobre su sistema radical, permite a los hongos mayor probabilidad de establecerse y expresar sus beneficios en corto tiempo de uno a cuatro meses, dependiendo del frutal que se trate (Alarcón, 2001). Estas metodologías de inoculación aquí mencionadas, aseguran que las plántulas crecerán con el simbiote previamente inoculado, propiciando con ello, los beneficios de la simbiosis (Alarcón, 2001).

2.4 Factores que afectan la efectividad de los inoculantes.

La efectividad de un inoculante se refiere a la capacidad de estimular el beneficio en la planta inoculada, el cual se puede medir en base a la medición de la altura, diámetro de tallo, crecimiento, y además por la calidad de planta producida (Davies *et al.*, 2000). Sin embargo, existen diversos factores que están directamente involucrados en la mayor expresión de la efectividad de los inoculante en el vivero (Alarcón y Ferrera- Cerrato, 1999), los cuales se mencionarán a continuación:

2.4.1 Planta. El conocimiento de la especie vegetal es un aspecto importante a considerar. Si bien la simbiosis micorrízica se puede establecer en más del 80% de las plantas conocidas, también es cierto que algunas de ellas responden de manera diferencial a la inoculación de hongos micorrícicos. Con base a lo anterior, es importante realizar la caracterización de plantas considerando la susceptibilidad a ser colonizadas por estos hongos y el grado de respuesta a la inoculación. Estos aspectos, permiten predecir la posible respuesta de las plantas a la inoculación de hongos micorrícicos. Gran parte de su respuesta positiva se debe a la presencia de sistemas radicales con limitación para absorber y aprovechar los nutrimentos contenidos en un suelo o sustrato (Alarcón, 2001).

2.4.2 Micotrofia. Este concepto corresponde al grado de dependencia de las plantas en su crecimiento y nutrición por la presencia de los hongos micorrícicos establecidos en el sistema radical. La micotrofia puede clasificarse en tres tipos: (a) plantas no micotróficas, cuya su nutrición no depende del establecimiento de los hongos (Crucíferas, Amarantáceas, Quenopodiaceas, Ciperáceas, *Lupinus albus*), aunque si pueden establecer una simbiosis efímera; (b) plantas micotróficas facultativas, aquellas que tienen mayor dependencia hacia los hongos de acuerdo a la disponibilidad o limitación de nutrimentos en el sustrato. Es decir, existen plantas que si se encuentran establecidas en sustratos con alta disponibilidad de nutrimentos, éstas son capaces de aprovechar los nutrimentos aún cuando se hayan establecido los hongos micorrícicos en la raíz, pero si estas mismas plantas se establecen en sustratos con limitación de nutrimentos, entonces la respuesta y la dependencia hacia los hongos son significativamente mayores.

Las plantas micotróficas obligadas (c) son aquellas que requieren forzosamente del establecimiento de la simbiosis micorrízica para poder así satisfacer sus requerimientos nutrimentales y presentar mayor capacidad de crecimiento y mayor vigor, caso de Pináceas, *Abies*, *Tsuga* y *Pseudotsuga*, principalmente para los hongos ectomicorrícicos y la mayoría de las especies frutales arbóreas y algunas forestales latifoliadas, para los hongos micorrícicos arbusculares (Alarcón *et al.*, 2001).

2.4.3 Relación infectividad versus efectividad. Esto corresponde a la capacidad infectiva y efectiva de los inoculantes. Como infectividad se entiende la capacidad de los hongos de un inoculante para establecerse en el sistema radical de las plantas. La efectividad, por su parte, se relaciona con la capacidad de los hongos de un inoculante en promover el crecimiento, sanidad y vigor de las plantas (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999). Cabe aclarar que estos dos conceptos no están correlacionados, es decir, no necesariamente los hongos que se establezcan abundantemente (80-90% de colonización), en el sistema radical de las plantas, pueden inducir mayores efectos, ya que se pueden encontrar hongos que colonicen la raíz en menor proporción (15-40%) y muestren excelentes efectos en la nutrición y crecimiento de las plantas. Con esto se denota la importancia de utilizar hongos cuya característica principal sea propiciar el mayor beneficio a la planta, en cualquiera de las variables que se tengan como objetivo, independientemente del grado de colonización que estos hongos presenten en el sistema radical. Con ello, es posible determinar la dependencia micorrízica de las plantas de un vivero, entendiéndose ésta como el grado de respuesta en crecimiento o nutrición de las plantas por efecto de la inoculación de hongos micorrícicos, en función de las características de fertilidad de los sustratos en los que se establezcan las plantas (Alarcón *et al.*, 2001).

2.4.4 Sustrato. El sustrato de crecimiento para las plantas tiene relevante importancia en función del contenido nutrimental y características físicas y biológicas. De esta misma forma, el sustrato es fundamental en el establecimiento y funcionalidad de la simbiosis micorrízica y para que el efecto benéfico de la simbiosis se exprese, se requiere de la esterilización y/o desinfección (solarización, fumigación, vaporización) del sustrato con el fin de evitar posibles daños por la presencia de microorganismos fitopatógenos que además de ser una fuente de diseminación de

enfermedades también pueden influir en la capacidad de los hongos micorrícicos de colonizar el sistema radical. Mediante esta sencilla práctica no solo se asegura que la simbiosis se establezca y sea funcional sino también se evita la proliferación de enfermedades de hábito radical que afectan la sanidad, crecimiento y vigor de las plantas (Alarcón *et al.*, 2001).

2.4.5 Características químicas. Sin lugar a dudas, las características químicas de los sustratos utilizados en viveros son fundamentales para abastecer de nutrimentos a las plantas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que sustratos altamente ricos en materia orgánica y particularmente fósforo, pueden inhibir la simbiosis micorrízica. Con esto se trata de puntualizar que no precisamente se requiere utilizar sustratos ricos en nutrimentos sino que es posible utilizar sustratos con limitación nutrimental de modo que la simbiosis establecida funcione adecuadamente en el aprovechamiento de los nutrimentos existentes y que deben de reflejarse en el buen desarrollo de las plantas. No obstante, es importante conocer algunos aspectos considerados como adecuados en la literatura como el pH que debe de ser 5.8–7.5, contenido de fósforo disponible menor de $20\mu\text{g g}^{-1}$ de sustrato, materia orgánica menor al 2.0% y tener una conductividad eléctrica o contenido de sales menor a 1.0 dS m^{-1} , que no sólo afectan la simbiosis, sino también a las plantas del vivero (Alarcón *et al.*, 2001).

2.4.6 Manejo en el vivero. Uno de los aspectos importantes que repercuten en la efectividad de los inoculantes con base en hongos micorrícicos en el incremento de la calidad de las plantas, es la aplicación de productos químicos como los fertilizantes y plaguicidas (Alarcón *et al.*, 2001).

2.4.7 Fertilización. La aplicación de fertilizantes, particularmente fosfatados, puede ser reducida cuando se utilizan los inoculantes de hongos micorrícicos, ya que los hongos favorecen el aprovechamiento más eficiente de los nutrimentos inorgánicos contenidos en el sustrato. Además, este beneficio de los hongos permite utilizar en forma más racionada los fertilizantes y con ello reducir los costos de producción de plantas. Es posible utilizar fertilizantes de liberación lenta, de modo que las plantas en simbiosis puedan aprovechar los nutrimentos durante sus diferentes etapas fenológicas (Alarcón *et al.*, 2001).

2.4.8 Aplicación de plaguicidas. En la actualidad es posible encontrar diversos productos de plaguicidas que se venden comercialmente; de acuerdo a su acción sobre organismos específicos se pueden clasificar en insecticidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas. Todos ellos pueden afectar diferencialmente a la simbiosis micorrízica, de acuerdo con la susceptibilidad de los hongos al ingrediente activo así como por su modo de acción ya sea sistémico o de contacto. Aun cuando el uso de estos productos es un aspecto importante de manejo en el vivero, es mejor utilizarlos en menor proporción y en dosis adecuadas de modo que con ello, se eviten problemas relacionados con la disminución de la efectividad de los hongos micorrízicos así como evitar problemas de contaminación ambiental que se generan por su aplicación (Alarcón *et al.*, 2001).

2.5 Utilización de esferas de alginato de calcio.

2.5.1 Extracción de alginatos.

Los alginatos se encuentran en las algas pardas como componentes estructurales de la pared celular. Las principales fuentes comerciales son especies de *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria*. De éstas las más importantes son *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum* (Brito, 2001).

El ácido algínico es un polímero lineal basado en dos unidades monoméricas, ácido β -D manurónico y ácido α -L gulurónico, unidos por enlaces 1-4. Después de su extracción y purificación, son utilizados como espesantes, estabilizantes y gelificantes en una amplia gama de productos en las industrias alimentaria, farmacéutica, textil y en otras aplicaciones industriales (Brito, 2001). Estos son solubles en agua a temperatura ambiente como es el alginato de Na^+ , este gelifica en presencia de ciertos iones polivalentes (Brito, 2001).

2.5.2 Aplicaciones de esferas de alginato en biotecnología.

Para la inmovilización de células han sido utilizadas numerosas materias como son el alginato, agar, gelatina y karragenina, así como también materias porosas y no porosas de apoyo como astillas de madera, acero, piedra volcánica, tela de algodón, vidrio poroso, celulosa, sílice porosa y cerámica porosa, entre otras (Nedovic *et al.*, 1999). Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación.

En general una solución de alginato de Na^+ se deja gotear en una solución de CaCl_2 obteniéndose en tiempos cortos, matrices esféricas de tamaño controlado y homogéneo. Es un método que presenta gran flexibilidad, pues alginatos de distinto peso molecular y distinta composición química rinden geles de muy buenas características químicas y físicas (Navarro, 2002).

La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan excelentes propiedades físicas como:

- a. Permitir que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente.
- b. No requerir solventes orgánicos tóxicos
- c. Elevado grado de porosidad
- d. Permitir una alta velocidad de difusión para macromoléculas, y la posibilidad de controlar dicha difusión.
- e. Es posible disolver y degradar bajo condiciones fisiológicas normales (Villena *et al.*, 2009).

En cuanto a la liberación de biomoléculas encapsuladas en esferas de alginato de calcio Roumeau, (2001) afirma que esta varía de acuerdo a la concentración de alginato de sodio en cloruro de calcio que se realiza en la reacción. Esto queda demostrado en un estudio realizado por Al-Zahrani (1999), en el cual prueba tres dosis distintas de alginato de sodio y cloruro de calcio. Este señala que la cantidad de sulfametoxazol (una droga modelo) liberada cambia levemente con la variación de la concentración de alginato.

La liberación total de sulfametoxazol cuando se utiliza una concentración del 1% de la solución de alginato de sodio resulto ser del 80% del contenido total de la droga. La liberación bajaba a 72% y 68% cuando se utilizaban soluciones de alginato de sodio de 1.55 y 2% respectivamente. En cuanto a las concentraciones de cloruro de calcio estas fueron de 5%, 10% y 15%. Esto indica que a mayor concentración de alginato de sodio mayor es la resistencia a la liberación de la célula atrapada en las esferas de alginato de calcio.

En Chile, se realizó un estudio que comprobó el aislamiento de *Beauveria bassiana* Qu-B306, la cual posee actividad patogénica sobre *Aegorhinus superciliosus*, para ello se desarrolló una preparación granular en base a alginato de sodio, se evaluó la incorporación de quitina y afrecho de trigo. Los encapsulados fueron depositados en cámaras húmedas a 28°C y transcurridos 21 días se contabilizó la producción de conidias. Se observó una correlación positiva de la producción de conidias con el aumento de quitina y la adición de afrecho de trigo hasta la concentración de 2,2%, luego de esto la producción de conidias disminuyó. Con la preparación seleccionada se evaluó el crecimiento del hongo a partir de encapsulados en contenedores con suelo a distintas temperaturas y en forma paralela se evaluó la producción de conidias en cámara húmeda. La temperatura óptima fue 21,9°C y para el ensayo de producción *in vitro* fue 27,2°C. Los resultados muestran que el hongo encapsulado es capaz de germinar y reproducirse en todas las temperaturas analizadas (Sepúlveda, 2005).

El objetivo de adicionar alginato de sodio para la encapsulación de un hongo entomopatógeno es mejorar su eficacia en condiciones de campo, facilitar la manipulación y la aplicación, tener un producto biodegradable, y aumentar la estabilidad durante el almacenamiento, características con las que se pretende minimizar el costo y la pérdida de las características del producto (Batista Filho *et al.*, 1998; Carballo, 1998). Además el uso de alginato previene la degradación del hongo por la radiación solar (Pereira y Roberts, 1991). Lo propuesto anteriormente es muy importante ya que existen distintos grados de sensibilidad de los entomopatógenos a la radiación solar, que actúa directamente sobre los ácidos nucleicos, impidiendo así el crecimiento y la multiplicación de estos microorganismos (Lecuona *et al.*, 1996; Batista Filho *et al.*, 1998).

El alginato también sirve como medio físico sobre el cual el patógeno, en este caso el hongo, puede crecer una vez que las esferas encuentran las condiciones favorables (Batista Filho *et al.*, 1998).

Por otra parte ofrece la ventaja de poder encapsular junto con el patógeno algún otro material que beneficie el almacenamiento o crecimiento del mismo. De este modo se pueden adicionar nutrientes para que cuando las esferas formen, éstos sean inmovilizados junto con el microorganismo y si las condiciones son nuevamente ideales para la activación del patógeno, los nutrientes estarán disponibles para su uso (Batista Filho *et al.*, 1998; Thorvilson *et al.*, 2002).

2.5.3 Viabilidad de células contenidas en esferas de alginato.

Roumeau, (2001) establece que la efectividad de un inóculo se asocia con sus características como fuente de propágulos. La viabilidad se relaciona con la habilidad de mantener sus cualidades micorrícicas en un periodo de tiempo. En general, la efectividad y viabilidad no siempre están directamente relacionadas. Por consiguiente, el inóculo ideal es un compromiso entre estos dos atributos.

Según Tommerup *et al.*, (1987), los inoculantes eficaces y prácticos deben satisfacer los siguientes criterios:

1. El hongo micorrícico a inocular debe ser eficaz.
2. El inóculo debe producirse axénicamente y debe mantenerse en un estado fisiológico tal que sea consistente para el almacenamiento, inoculación e iniciación de la micorrización.
3. El material portador debe proteger el microorganismo contra la tensión fisiológica en el proceso de producción.
4. Los inóculos deben presentar características que permitan una producción, faciliten su manejo y sean capaces de ser dosificados en cantidades consistentes de biomasa.

Kuek, (1991) afirma que el inoculante formado por hongos micorrícicos atrapados en esferas de alginato de calcio satisfacen todos los criterios anteriormente señalados.

Kuek *et al.*, (1992), probaron la viabilidad de 6 sepas de hongos de diferentes especies atrapadas en matrices de alginato de calcio, con lo cual llega a la conclusión y constata que la viabilidad depende de la especie de hongo utilizada.

Navarro, (2002), luego de encapsular meristemas de papa (*Solanum tuberosum*) para la crioconservación y propagación en invernadero, afirmó obtener un 100% de sobrevivencia cuando los meristemas fueron encapsulados y cultivados en medio semi-sólido en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, el encapsulado en alginato de calcio no presenta factores inhibidores sobre el crecimiento de los meristemas, ni representa una barrera para la elongación del brote.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de realización del estudio. El desarrollo de esta investigación fue dividida en cuatro etapas:

Primera etapa. Esta consistió en la colecta de ejemplares de *Gaultheria pumila* en el Parque Nacional Villarrica, el que se ubica en la comuna de Pucón, Región de La Araucanía. Inserto en la Cordillera de Los Andes, entre los 900 a 1800 m.s.n.m. Con una topografía fuertemente ondulada y pendientes entre 15% a 30%.

Segunda etapa. Colecta de plantas de *Vaccinium corymbosum*, en el predio Los Sauces, situado a 3 kilómetros al Sur - Este de la ciudad de Nacimiento, Región del Bio Bío, a una altitud de 70 m.s.n.m. y con coordenadas 37° 30' L.S. y 72°40' L.O.

Tercera etapa. Se elaboraron esferas de Alginato de Calcio, trabajo que fue realizado en el Laboratorio de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales perteneciente a la Universidad de La Frontera.

Cuarta etapa. Inoculación de las plántulas con la utilización de esferas de alginato de calcio, la cual fue realizada en el predio Los Sauces.



Figura 2. Mapa de la ubicación del Fundo Los Sauces.

3.2 Materiales.

3.2.1 Extracción del inóculo.

- ✓ Bolsas de papel
- ✓ Bolsas herméticas de polietileno
- ✓ Palas
- ✓ Tijeras de podar
- ✓ Etiquetas adhesivas
- ✓ Lápiz indeleble

3.2.2 Elaboración de esferas de alginato de calcio.

A. Materiales de laboratorio.

- ✓ Bomba peristáltica
- ✓ Vasos de precipitado de 80 ml, 250 ml y 500 ml
- ✓ Pipeta
- ✓ Pinzas
- ✓ Espátulas
- ✓ Tamices de 425 micrones
- ✓ Balanza electrónica
- ✓ Piseta

B. Reactivos.

- ✓ Cloruro de calcio
- ✓ Alginato de sodio

C. Inóculo.

- ✓ Raíces trituradas de *Vaccinium corymbosum*
- ✓ Sustrato rizosférico de *Vaccinium corymbosum*
- ✓ Raíces trituradas de *Gaultheria pumila*
- ✓ Suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*
- ✓ Musgo de turbera (*Sphagnum magellanicum*)

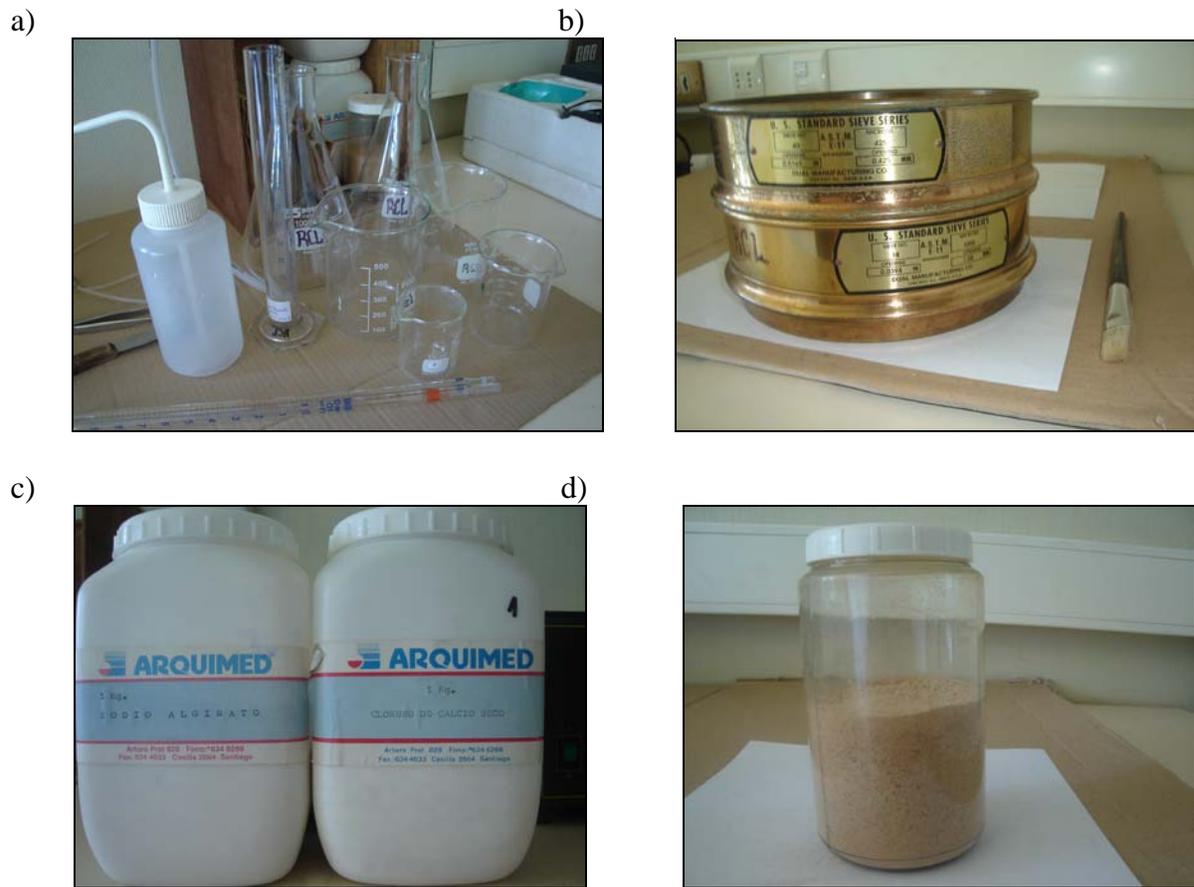


Figura 3. a) materiales utilizados en laboratorio para la elaboración de las esferas; b) Tamiz de 425 micrones; c) Alginato de sodio y Cloruro de calcio; d) *Sphagnum magellanicum*.

3.2.3 Medición de la colonización micorrícica ericoide.

A. Materiales de laboratorio.

- ✓ Estufa
- ✓ Vasos de precipitado de 500 ml, 250 ml, 80 ml
- ✓ Pipetas
- ✓ Balanza electrónica
- ✓ Placas Petri
- ✓ Baquetas y Pinzas
- ✓ Lupa estereoscópica
- ✓ Microscopio óptico

B. Reactivos.

- ✓ Alcohol 70%
- ✓ Hidróxido de Potasio al 10% (KOH)
- ✓ Hidróxido de Amonio (NH₄OH)
- ✓ Ácido Clorhídrico (HCL)
- ✓ Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)
- ✓ Ácido Láctico (C₃H₆O₃)
- ✓ Anilina Azul



Figura 4. Reactivos utilizados en tinción de endomicorrizas.

3.2.4 Medición de parámetros morfométricos.

Los parámetros morfométricos evaluados fueron:

- Longitud de tallo y raíz
- Diámetro del cuello de la raíz
- Peso fresco y seco de la biomasa aérea y radical

Materiales evaluación parámetros morfométricos.

- ✓ Balanza electrónica
- ✓ Regla graduada
- ✓ Guincha graduada
- ✓ Pie de metro
- ✓ Tijeras de podar
- ✓ Estufa de secado

3.3 Metodología.

3.3.1 Obtención del inóculo contenido en raíces.

Para la obtención del inóculo contenido en las raíces de *Vaccinium corymbosum* y *Gaultheria pumila* se realizaron los siguientes pasos:

1. Extracción de raíces de plantas previamente seleccionadas de *Vaccinium corymbosum* y *Gaultheria pumila*.
2. Lavado de raíces y secado a temperatura ambiente.
3. Traslado al laboratorio para ser cortadas, trituradas, tamizadas, y guardadas en bolsas de papel debidamente rotuladas.

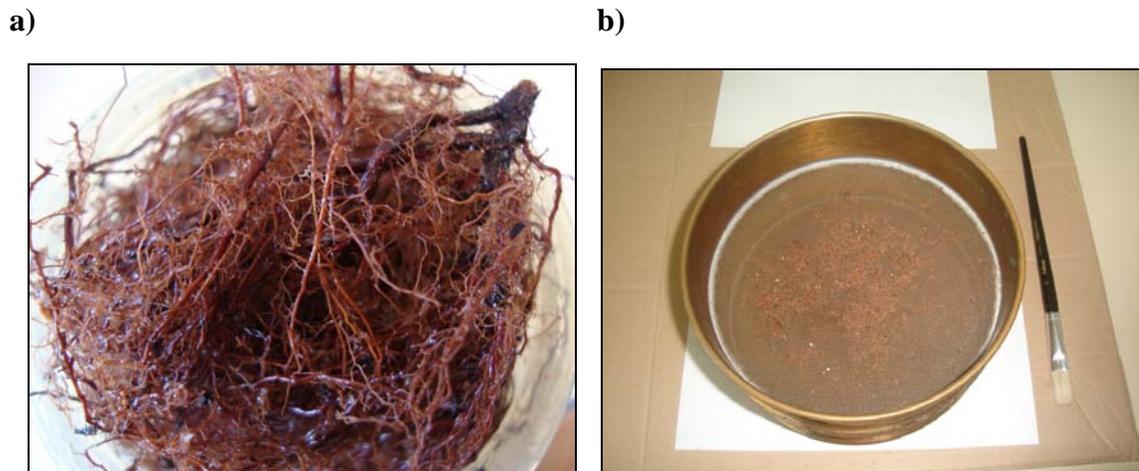


Figura 5. a) Raíces de *Vaccinium corymbosum*; b) Raíces de *Vaccinium corymbosum* en tamiz.

3.3.2 Obtención de inóculo contenido en suelo rizosférico.

1. Extracción de suelo rizosférico, este corresponde al de las plantas de *Vaccinium corymbosum* y *Gaultheria pumila* a las que se les extrajo el sistema radical.
2. Proceso de secado, se utilizaron cajas de cartón con superficie plana bajo condiciones de temperatura de invernadero.
3. Terminado el proceso de secado el suelo fue cernido en un colador convencional para la extracción del material de mayor tamaño. Posteriormente se tamizó con el objeto de seleccionar las partículas de suelo más pequeñas, de esta forma evitar que no exista algún inconveniente en el momento de elaborar las esferas. Finalizado esto se procedió a conservar el suelo en bolsas plásticas herméticas debidamente rotuladas.



Figura 6. Suelo rizosférico en proceso de secado bajo condiciones de invernadero.

Las plantas utilizadas en este estudio fueron seleccionadas en base al estudio realizado por Medina, (2009), quien demuestra el elevado número de esporas a nivel rizósferico y alto porcentaje de frecuencia e intensidad de colonización presente en plantas de *Gaultheria pumila* extraídas del Parque Nacional Villarrica.

3.3.3 Preparación de la mezcla con alginato de sodio.

El proceso consistió en depositar de manera pausada con un cernidor 10g de alginato de sodio en 500 ml de agua corriente contenida en un vaso precipitado, luego fue agregado 0,5 g del inóculo, posteriormente se incorporó 0,4 g de *Sphagnum magellanicum* y finalmente se homogenizó la mezcla. Esta dosis corresponde para esferas elaboradas con un 2% de alginato de sodio, ya que para aquellas que contenían un 4% la dosis fue de 20 g de alginato de sodio en 500 ml de agua, la cantidad de inóculo se conservó, al igual que la dosis de *Sphagnum magellanicum*. La dosis de inóculo utilizado correspondió a aquella establecida por Romeau (2001). La adición de *Sphagnum magellanicum* tiene como objetivo mantener un pH óptimo para el buen desarrollo de la micorriza. Es de vital importancia que la mezcla no se aglomere, para así evitar complicaciones al instante en que esta pase por la manguera de silicona utilizada en la elaboración de las esferas.

3.3.4 Preparación de la mezcla con cloruro de calcio.

Para esta solución fueron utilizados 50 g de cloruro de calcio disueltos en 500 ml de agua corriente, para lograr la homogeneidad óptima de la mezcla se trabajó con una baqueta.

a)



b)



Figura 7. a) Mezcla homogénea de alginato de sodio, inóculo y *Sphagnum magellanicum*; b) Cloruro de calcio disuelto en agua.

3.3.5 Elaboración de esferas de alginato de calcio.

Realizada la mezcla con alginato de sodio se procedió su incorporación en la solución de cloruro de calcio, con la utilización de una bomba peristáltica a una velocidad de 2 ml/minuto con la finalidad de obtener gotas de tamaño uniforme. Producto de la reacción entre estos dos reactivos se forman esferas de alginato de calcio y cloruro de sodio de manera instantánea.

Para evaluar el efecto de la densidad de las esferas, las dosis de alginato de sodio y cloruro de calcio correspondieron a 2% y 4%.

Es necesario mencionar que la elaboración de las esferas debió ser inspeccionado en todo momento para así evitar la unión entre cada una de estas.

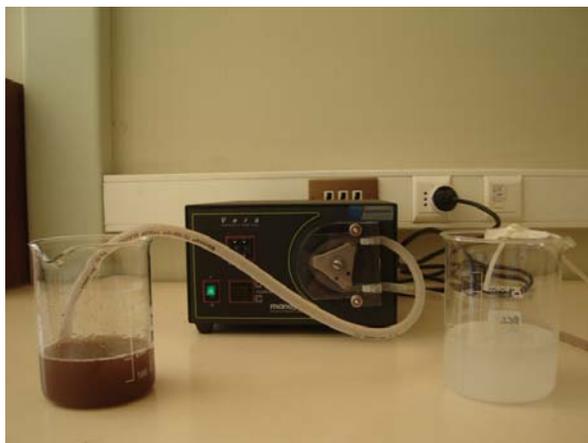


Figura 8. Montaje utilizado para la elaboración de esferas de alginato de calcio.



Figura 9. Esferas de alginato de calcio con inóculo micorrícico ericoide.

Una vez elaboradas las esferas de alginato de calcio, se conservaron en el refrigerador por 24 horas a una temperatura de 5°C para asegurar su reticulación. Luego estas debieron ser lavadas con abundante agua, para mas tarde ser almacenadas hasta el momento de su aplicación en frascos con tapa. Finalmente son rotuladas con la fecha correspondiente a la elaboración, el inóculo contenido y el porcentaje de alginato.

3.4 Plántulas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal inoculadas con la utilización de esferas de alginato de calcio.

Para la realización de este estudio se utilizaron plantas de arándano correspondientes a la variedad O`Neal, las cuales presentaban una data de 2 meses, estas se encontraban bajo condiciones de vivero, el sustrato en el cual se desarrollaron correspondió a una mezcla compuesta de vermiculita, perlita, aserrín de pino y acículas de pino.

3.5 Diseño experimental.

El ensayo de inoculación consistió en 5 tratamientos, cada uno de los cuales estaba compuesto por 20 repeticiones (Anexo 1). Para cada uno de los tratamientos se aplicaron 2 esferas por planta, estas fueron localizadas en el sistema radicular de *Vaccinium corymbosum* de la var. O`Neal y para ello se utilizaron pinzas y espátulas. Una vez incorporadas las esferas se restableció la posición de la plántula.

En este ensayo experimental se realizaron dos set en forma paralela, para ambos se utilizaron plantas de la misma especie, variedad, data, sustrato y condiciones de ambiente. En uno se inocularon plantas con la utilización de esferas elaboradas con un 2% de alginato de sodio, y el otro set correspondió a plantas inoculadas mediante esferas con un 4% de alginato de sodio.

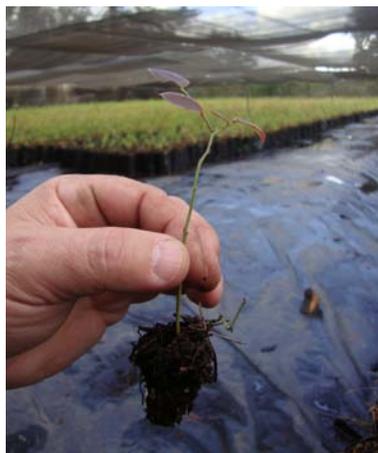
El tiempo transcurrido entre la aplicación de las esferas de alginato de calcio y la evaluación de parámetros morfométricos y colonización micorrícica ericoide fue de 115 días.

- 1) **Tratamiento 0:** Control: Esferas de alginato de calcio sin inóculo.
- 2) **Tratamiento 1:** Esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal.
- 3) **Tratamiento 2:** Esferas de alginato de calcio con raíces trituradas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal.

4) **Tratamiento 3:** Esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*.

5) **Tratamiento 4:** Esferas de alginato de calcio con raíces trituradas de *Gaultheria pumila*.

a)



b)



c)



Figura 10. a) Plántula de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal; b) Aplicación de esferas de alginato de calcio; c) Esferas de alginato de calcio recién aplicadas.

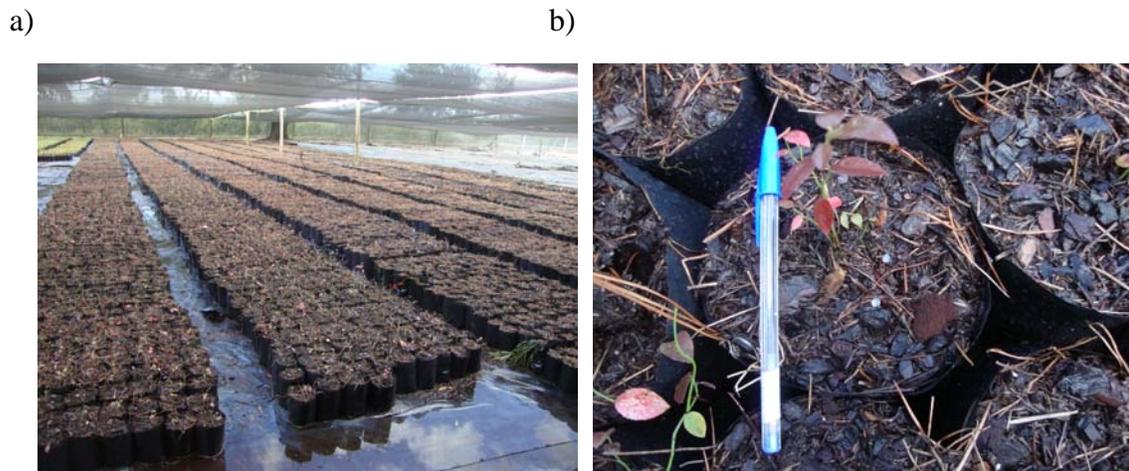


Figura 11. a) Plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal en vivero Los Sauces; b) Esferas de alginato de calcio en el sustrato de plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal.

3.6 Evaluación de la colonización micorrízica ericoide.

Una vez transcurrido el tiempo destinado para comenzar la evaluación, las plántulas son llevadas al laboratorio, el sistema radical de estas fue cortado y lavado cuidadosamente con la ayuda de un tamiz convencional con el objetivo de no perder material radical y que este se encuentre libre de materias ajenas como acículas de pino, aserrín o perlita. Luego las raíces son puestas en vasos de precipitado debidamente rotulados y es añadida una solución de KOH al 10%, para ser incubadas a una temperatura de 90°C por un periodo de 60 minutos en una estufa, esto se realizó con la finalidad de ablandar el tejido radical. Posteriormente se deja enfriar dentro de la misma estufa por 90 minutos y luego de manera cuidadosa se les lavó con agua corriente.

El paso siguiente correspondió al blanqueamiento de las raíces, para lo cual se preparó una solución de Peróxido de Hidrógeno de 20 volúmenes (H₂O₂) + Hidróxido de Amonio (NH₄OH) la que fue añadida a las raíces ya blandas y limpias. Bajo esta solución se les agitó cuidadosamente durante 15 minutos y fueron lavadas con abundante agua corriente. Posteriormente se procedió a acidificarlas en una solución de HCL al 1% por un lapso de 150 minutos y luego lavadas con suficiente agua.

Las raíces presentaron una coloración blanquecina y de una consistencia blanda, de esta forma fueron puestas en Placas de Petri en donde se les incorporó una solución de Anilina Azul por un tiempo aproximado de 5 minutos. A estas se les extrajo el sobrante de anilina y se les aplicó Ácido Láctico ($C_3H_6O_3$), finalmente fueron conservadas en frascos de vidrio de tamaño pequeño previamente rotulados hasta el momento de la evaluación.

Para la evaluación de frecuencia e intensidad de colonización micorrícica ericoide fue empleada una Placa de Petri con un reticulado de 1x1 mm. Las raíces previamente teñidas correspondientes cada una a un tratamiento, fueron divididas en dos muestras y cada una de ellas fueron distribuidas de manera homogénea en la placa, prontamente estas se observaron bajo una lupa estereoscópica y se contabilizaron las raíces que pasaban por los puntos de intersección del reticulado de la Placa de Petri, mediante un recorrido de orden preestablecido. Los valores de frecuencia e intensidad de colonización micorrícica ericoide se calcularon en base a la clase correspondiente de acuerdo al porcentaje de colonización en el sistema radical (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clases de intensidad de colonización micorrícica.

Clase	Descripción
0	Sin colonización
1	Hasta un 5% de colonización
2	Hasta un 6 - 25% de colonización
3	Hasta un 26 -50 % de colonización
4	Hasta un 51 - 75 % de colonización
5	Hasta un 76 - 100 % de colonización

Con los datos obtenidos de la evaluación se calcularon los porcentajes de frecuencia e intensidad de colonización. Para ello se utilizaron las siguientes formulas propuestas por Steubing *et al.*, (2002).

$$\text{Frecuencia} = \frac{100 \times (N - N^{\circ})}{N}$$

N = número total de puntos observados, por muestra.

N° = número de puntos observados sin colonización micorrícica.

$$\text{Intensidad} = \frac{2,5 \times C1 + 14,5 \times C2 + 38 \times C3 + 63 \times C4 + 87 \times C5}{N}$$

C1 = valor de la frecuencia de la clase 1, C2 = valor de la frecuencia de la clase 2,...

N = número de puntos observados en la muestra.

2,5; 14,5; 38; 63 y 87 = corresponden al factor a utilizar en el cálculo de intensidad, obtenidos de la media aritmética de cada clase (C1, C2, C3, C4, C5).

La frecuencia de colonización micorrícica se refiere al número de veces en que es posible constatar la presencia de hifas en el interior de las células radicales y la intensidad es el grado o nivel en que las células radicales son colonizadas por elementos y estructuras fúngicas.

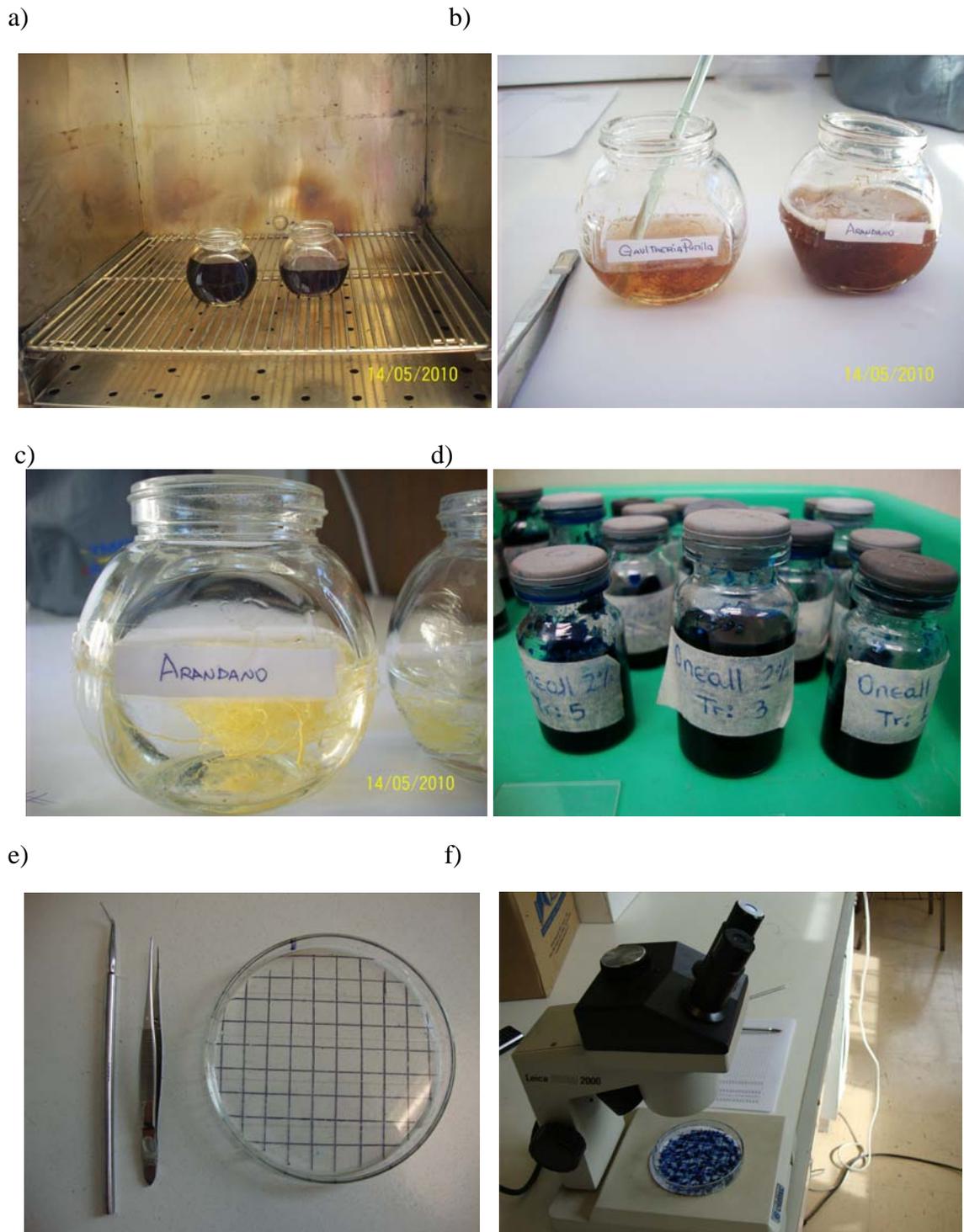


Figura 12. a) Raíces puestas en estufa; b) Raíces en solución de Peróxido de Hidrógeno + Hidróxido de Amonio; c) Raíces en solución de HCL; d) Frascos rotulados con los distintos tratamientos evaluados; e) Materiales utilizados en evaluación de colonización micorrícica ericoide; f) Montaje con lupa estereoscópica y raíces teñidas contenidas en placa Petri.

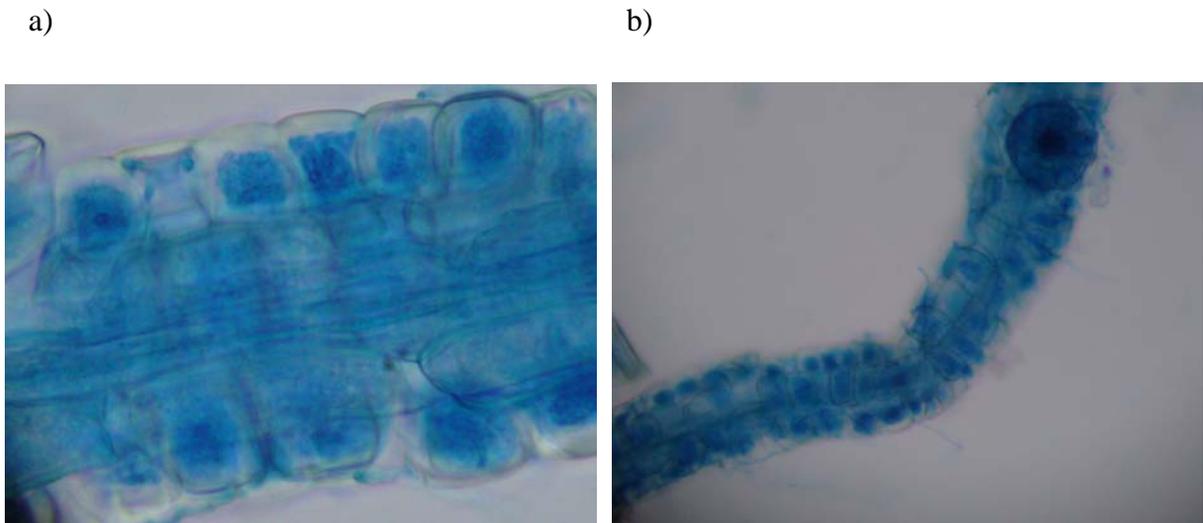


Figura 13. a), b) Raíz de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal con evidente presencia de colonización micorrícica ericoide.

3.7 Medición de parámetros morfométricos.

Para la medición de los parámetros morfométricos se separaron 15 plantas al azar por cada uno de los tratamientos, los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- A) Diámetro del cuello (DAC) (mm):** medida tomada a nivel del cuello, el cual fue definido como la zona donde se produce una clara diferenciación de color entre el tallo y la raíz. Éste fue determinado con un pie de metro y expresado en milímetros.
- B) Largo del tallo (LT) (cm):** medida tomada desde el cuello hasta el ápice caulinar de la planta, determinada con una regla graduada, se expresan sus valores en centímetros.
- C) Largo de la raíz (LR) (cm):** medida tomada desde el cuello de la planta hasta el extremo de la raíz principal, fue determinada con una huincha graduada, expresando sus valores en centímetros.

D) Peso fresco tallo – raíz (PFT)-(PFR) (g): medida obtenida al separar la parte aérea de la radicular, para luego pesarlas independientemente en una balanza de precisión, expresando los valores en gramos.

E) Peso seco tallo – raíz (PST)-(PSR) (g): medida obtenida, al poner en una bolsa de papel la parte aérea y radicular de la plántula en forma separada, posteriormente depositadas en una estufa a 90°C hasta obtener un peso constante, luego fueron pesadas en una balanza por separado, se expresan los valores en gramos.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Frecuencia e intensidad de colonización en plantas inoculadas y control de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal.

En la Figura 13 se presenta la frecuencia de colonización micorrícica ericoide que presentaron las plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal una vez transcurrido el proceso de inoculación a través de esferas de alginato de calcio.

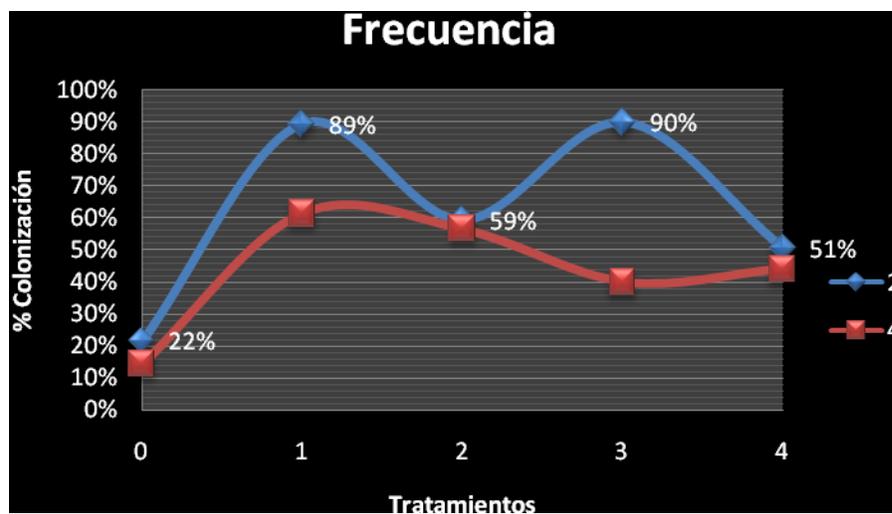


Figura 14. Gráfico de frecuencia obtenida en evaluación de colonización micorrícica ericoide en plántulas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal.

En la Figura 13 se observa la variación del porcentaje de frecuencia de colonización micorrícica ericoide con cada uno de los tratamientos aplicados en plántulas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal, con ello se destaca que los tratamientos 1 y 3 fueron los que presentaron una mayor frecuencia con un 89% y 90% respectivamente, esto indica que la inoculación con esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum* y *Gaultheria pumila* se presenta como el más eficiente de los tratamientos. Estos porcentajes concuerdan con los resultados obtenidos por Bustos (2010), cuyos valores de frecuencia e intensidad de colonización fueron de 94,3 y 38,5% respectivamente al inocular plantas de *Vaccinium corymbosum* var. Legacy con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila* obtenido del

Parque Nacional Villarrica. Además, según Rodríguez (2007) cuando se inoculan plantas de arándano con suelo rizosférico de *Ericáceas* se logra una mayor micorrización.

Respecto a la densidad de elaboración de las esferas, se observa que aquellas que contenían un 2% de alginato de sodio presentaron la mayor frecuencia de colonización, a diferencia de aquellas elaboradas con un 4%. Una mayor densidad de la esfera trae como consecuencia una menor liberación del inóculo micorrízico ericoide. Este resultado afirma lo establecido con Roumeau (2001) ya que indica en su estudio que la liberación de biomoléculas varía de acuerdo a la concentración de alginato de sodio en cloruro de calcio que se realiza en la reacción.

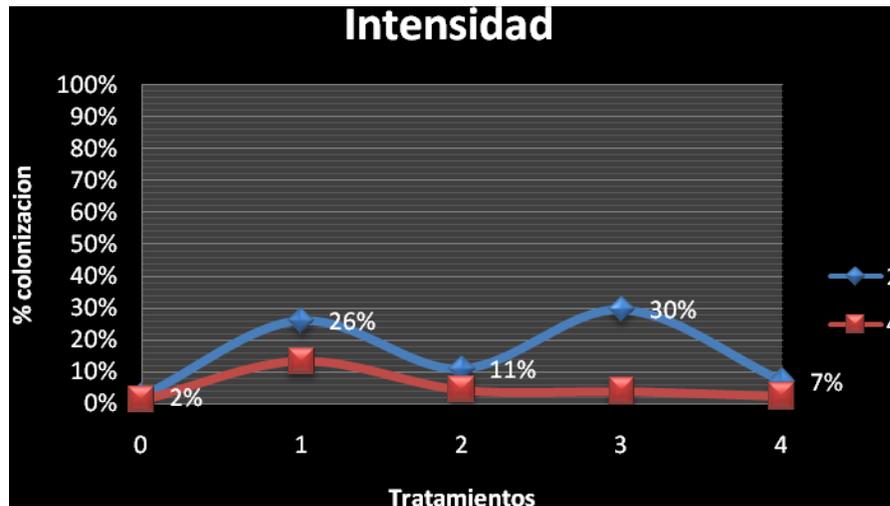


Figura 15. Grado de intensidad de micorrización ericoide presentado en plántulas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.

En la Figura 14 se observa el grado de intensidad de micorrización ericoide, en ella se identifican dos puntos pick que representan a los tratamientos con mayor porcentaje de colonización, aquí se destaca una vez más que al incorporar suelo rizosférico de *Gaultheria pumila* como inóculo micorrízico ericoide se logró la mayor intensidad de colonización. Este resultado concuerda con lo propuesto por Medina (2009) quien afirma que las especies de ericáceas que se han desarrollado en ecosistemas naturales tienen una escasa o nula intervención antrópica, por lo tanto ausencia de labores agronómicas que van en desmedro de la presencia de

propágulos y colonización micorrízica. Además, *Gaultheria pumila* es una especie que normalmente se encuentra asociado a ambientes restrictivos, como son suelos delgados, nutricionalmente pobres y ácidos, lo que genera en la planta condiciones de permanente estrés tornándose necesaria la existencia de la simbiosis, situación que queda reflejada en la intensidad de colonización.

En cuanto a la densidad de las esferas se demuestra que aquellas elaboradas con un 2% de alginato de sodio, al igual que en la evaluación de frecuencia, presentan el mayor porcentaje colonización ericoide.

4.2 Parámetros morfológicos para plantas inoculadas y control de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.

4.2.1 Longitud de la Raíz. Se realizó un análisis estadístico ANOVA (Anexo 2), el cual arrojó como resultado que existen diferencias estadísticas significativas entre las medias de este parámetro ($p < 0,05$). También se llevó a efecto un test de Tukey para la evaluación de los tratamientos y densidad de las esferas, se obtuvieron los siguientes resultados (Cuadro4). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico J.M.P versión 5.0.1 para Windows.

Cuadro 4. Valores medios para la variable longitud de raíz medida en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.

Nivel				Media
2	A			5,81
3	A			5,78
4	A			5,75
1		B		4,44
Control			C	3,11

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas
 1= Esferas con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum*; 2= Esferas con raíces de *Vaccinium corymbosum*; 3= Esferas con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*; 4=Esferas con raíces de *Gaultheria pumila*.

En el Cuadro 4 se observa que los tratamientos 2, 3 y 4 poseen medias similares, mientras que el control expresa las medias mas bajas, además que el tratamiento 1 presenta un valor intermedio entre el resto de los tratamientos y control. Esto indica que la longitud de la raíz se ve favorecida cuando se aplicaron esferas con raíces de *Vaccinium corymbosum*, o suelo rizosférico de *Gaultheria pumila* o con raíces de *Gaultheria pumila*. Por lo tanto, una vez mas se destaca la eficiencia de *Gaultheria pumila* como fuente de inóculo micorrizico ericoide.

Cuadro 5. Valores medios para la concentración de alginato de sodio en la variable longitud de raíz.

Nivel		Media
2	A	5,12
4	A	4,84

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas
 2= esferas de alginato de calcio al 2% de alginato de sodio; 4= esferas de alginato de calcio al 4% de alginato de sodio.

En cuanto a la concentración de alginato de sodio se observa en el Cuadro 5 que no hay respuestas significativas al evaluar la longitud de la raíz luego de aplicar esferas de alginato de calcio con diferentes densidades, ya sea una concentración del 2% o 4% de alginato de sodio. Esto no concuerda con los datos obtenidos en la evaluación de frecuencia e intensidad micorrícica ericoide, ya que esta indica que aquellas esferas elaboradas con un 2% de alginato de sodio obtuvieron los mayores porcentajes de colonización, ello podría indicar que se requiere de mayor tiempo para la evaluación de este parámetro.

4.2.2 Longitud del tallo. El resultado obtenido del análisis de Varianza (Anexo 3) indica que si existen diferencias estadísticas significativas, ya sea para los tratamientos y el porcentaje de alginato de sodio, por lo tanto fue necesario realizar un test de Tukey, en el cual se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro 6. Valores medios para la variable Longitud del tallo en plantas de *Vaccinium corymbosum*.

Nivel					Media
3	A				14,65
4	A				14,46
2		B			12,30
1			C		10,70
Control				D	7,63

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas.

1= Esferas con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum*; 2= Esferas con raíces de *Vaccinium corymbosum*; 3= Esferas con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*; 4=Esferas con raíces de *Gaultheria pumila*.

En el Cuadro 6 se observa que los tratamientos 3 y 4 poseen las medias más altas y además son similares entre si, mientras que el control expresa las medias mas bajas, en cuanto al tratamiento 2 y 1 presentaron valores intermedios entre el resto de los tratamientos y control. Por lo tanto, la mayor eficiencia en cuanto a la longitud de tallo se obtiene a través de la aplicación de esferas ya sea con suelo rizosférico o raíces de *Gaultheria pumila*.

Cuadro 7. Valores medios para la concentración de alginato de sodio en la variable longitud de raíz

Nivel			Media
4	A		12,44
2		B	11,46

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas

4= esferas de alginato de calcio al 4% de alginato de sodio; 2= esferas de alginato de calcio al 2% de alginato de sodio.

En el Cuadro 7 se observa claramente que existen diferencias significativas entre concentraciones de alginato de calcio, obteniendo la media más alta aquellas esferas con un 4% de alginato de sodio, a diferencia de aquellas elaboradas con un 2% las cuales presentan los valores más bajos.

4.2.3 Diámetro del cuello de la raíz.

Según el análisis de varianza (Anexo 4) indica que existen diferencias estadísticas significativas ya sea para los tratamientos y concentración de alginato de sodio.

Se realizó un test de Tukey y se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro 8. Valores medios para la variable evaluada de diámetro del tallo.

Nivel					Media
4	A				0,20
3	A	B			0,19
2		B	C		0,16
1			C	D	0,14
Control				D	0,11

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas

1= Esferas con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum*; 2= Esferas con raíces de *Vaccinium corymbosum*; 3= Esferas con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*; 4=Esferas con raíces de *Gaultheria pumila*.

En el Cuadro 8 se muestra que para la variable diámetro del cuello existieron diferencias significativas de las plantas tratadas con esferas de alginato de calcio que contenían raíces de *Gaultheria pumila* como inóculo respecto del control, sin embargo el resto de los tratamientos no presentaron diferencias ya que sus valores fueron similares entre si. Un mayor diámetro de cuello significa una mayor lignificación, esto le confiere a la planta en el momento del trasplante desde el vivero a terreno una mayor resistencia a los cambios ambientales, sean estos de

temperaturas altas, estrés hídrico, también a mayor diámetro de cuello hay una mayor lignificación de la planta, por lo tanto adopta una mayor resistencia a enfermedades y patógenos.

Cuadro 9. Valores medios para la concentración de alginato de sodio en la variable diámetro del cuello

Nivel			Media
4	A		0,17
2		B	0,15

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas
4= esferas de alginato de calcio al 4% de alginato de sodio; 2= esferas de alginato de calcio al 2% de alginato de sodio.

El Cuadro 9 indica que se obtuvo un mayor diámetro de cuello luego de aplicar esferas al 4%, mientras que este parámetro se vió disminuido al aplicar esferas con un 2% de alginato de sodio.

4.3 Parámetros de peso seco para plantas inoculadas y control de *Vaccinium corymbosum*.

4.3.1 Peso seco de la raíz.

Los resultados de la evaluación del análisis estadístico ANOVA (Anexo 5) para el peso seco de la raíz indican que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Se realizó un test de Tukey para evaluar este parámetro.

En el Cuadro 10 se representa como los tratamientos 4 y 3 poseen las medias más altas en cuanto al peso seco de la raíz de las plantas tratadas, por otra parte se observa que aquellas plantas evaluadas con los tratamientos 2 y 1 presentaron las medias mas bajas, por lo tanto manifestaron un deficiente desarrollo radicular, incluso llega a presentar valores similares al tratamiento control. Entonces, al incorporar ya sean raíces o suelo rizosférico de *Gaultheria pumila* en esferas de alginato de calcio permitirán un mayor peso seco de la raíz, esto según Bustos (2010), significa que permite a la planta tener contacto con un mayor volumen de suelo y por lo tanto mejorar considerablemente sus aspectos de abastecimiento de agua y nutricional.

Cuadro 10. Valores medios para la variable evaluada de peso seco de la raíz.

Nivel			Media
4	A		0,22
3	A		0,19
2		B	0,13
1		B	0,11
Control		B	0,08

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas
 1= Esferas con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum*; 2= Esferas con raíces de *Vaccinium corymbosum*; 3= Esferas con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*; 4=Esferas con raíces de *Gaultheria pumila*.

Cuadro 11. Valores medios para la concentración de alginato de sodio en la variable peso seco de la raíz.

Nivel			Media
4	A		0,17
2		B	0,13

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas
 4= esferas de alginato de calcio al 4% de alginato de sodio; 2= esferas de alginato de calcio al 2% de alginato de sodio.

En el Cuadro 11 se observan diferencias estadísticas significativas entre concentraciones de alginato de sodio, los valores más altos obtenidos correspondieron a aquellas esferas elaboradas con un 4%, lo cual se tradujo en un mayor peso seco de la raíz, a diferencia de esto las esferas que contenían un 2% expresaron las medias mas bajas.

4.3.2 Peso seco del tallo. En relación a los resultados entregados por el análisis de varianza (Anexo 6) aplicado al peso seco del tallo, se observa que existen diferencias estadísticas significativas de las medias entre los tratamientos. Los resultados del test de Tukey realizado a los tratamientos y concentración de alginato se observan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Valores medios para la variable evaluada de peso seco del tallo.

Nivel			Media
3	A		0,21
4	A		0,19
2		B	0,13
1		B	0,11
Control		B	0,10

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas

1= Esferas con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum*; 2= Esferas con raíces de *Vaccinium corymbosum*; 3= Esferas con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*; 4=Esferas con raíces de *Gaultheria pumila*.

En el Cuadro 12 es posible observar que los tratamientos 3 y 4 presentaron los valores medios más altos, a diferencia de los tratamientos 2, 1 considerando que estos expresaron valores intermedios al igual que el tratamiento control, ello indica que los valores mas altos en la evaluación del peso seco se obtuvo al utilizar como fuente de inóculo suelo rizosférico o raíces de *Gaultheria pumila*.

Cuadro 13. Valores medios para la concentración de alginato de sodio en la variable peso seco del tallo.

Nivel			Media
4	A		0,16
2		B	0,13

Niveles no conectados con las mismas letras significa diferencias estadísticamente significativas
 4= esferas de alginato de calcio al 4% de alginato de sodio; 2= esferas de alginato de calcio al 2% de alginato de sodio.

El Cuadro 13 muestra diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de alginato de sodio, los valores más altos los presentan aquellas esferas elaboradas con un 4%, lo cual indica que se obtuvo un mayor peso seco del tallo, y las medias más bajas corresponden a las esferas con un 2% de este compuesto.

Al observar los resultados obtenidos en las variables longitud de raíz, longitud de tallo, diámetro del cuello, peso seco de raíz y peso seco del tallo, es posible comprobar que el tratamiento 1, correspondiente a esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum* presentó siempre los valores más bajos en relación al resto de los tratamientos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Carrillo *et al.*, (2009) quienes luego de realizar una evaluación de la colonización micorrícica en plantas de *Vaccinium corymbosum* L. CV. Duke cultivadas en un huerto de la región del Bio Bío concluyen que existe una escasa presencia de hongos micorrícicos ericoide en el suelo rizosférico de estas plantas, ello se debe a que corresponde a una especie exótica. Además, Carrillo *et al.*, (2009) afirman que no existen antecedentes que describan la presencia de esporas ni redes de hifas en el suelo previo a la plantación de arándanos para esta ubicación geográfica.

No obstante, los resultados de frecuencia e intensidad de colonización micorrícica obtenidos en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal inoculadas mediante esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de arándano presentaron la mayor colonización por parte de los hongos simbiotes. Entonces, este estudio afirma que a pesar de existir una alta frecuencia e intensidad de colonización micorrícica, la baja eficiencia de los hongos micorrícicos presentes

en la rizósfera de un huerto de arándanos establecidos, no refleja los reales beneficios que entrega este tipo de asociación a la especie vegetal cultivada. Rodríguez (2007) indica que el conocer la especificidad y eficiencia de los hongos colonizadores de la raíz es necesario para obtener resultados favorables en el desarrollo de plantas inoculadas.

Scagel (2005), afirma que la disponibilidad de nutrientes puede influenciar en la colonización y la respuesta al crecimiento, sin embargo, aspectos de especificidad del huésped respecto al hongo y la disponibilidad de inóculo juegan un rol importante en la colonización por micorrizas ericoides en la producción de plantas en vivero.

En cuanto a los valores mas altos obtenidos en la evaluación de longitud de tallo, longitud de raíz, peso seco del la raíz y peso seco del tallo correspondieron a plantas inoculadas con esferas de alginato de calcio con raíces o suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*. Sin embargo, los resultados obtenidos de frecuencia e intensidad de colonización indican que aquellas plantas inoculadas con estos tratamientos registraron los valores más bajos. Por lo tanto, esto demuestra la alta eficiencia que posee la rizósfera de *G. pumila* al ser utilizada como fuente de inóculo. Esto coincide con Rodríguez (2007), quien observa que plantas micropropagadas con micorrizas ericoides presentan un mayor desarrollo pese a mostrar uno de los menores porcentajes de infección micorrízica.

La especie *Gaultheria pumila* se caracteriza por habitar ambientes nutricionalmente restrictivos, los cuales coinciden con los medios naturales donde se genera el desarrollo de hongos micorrícicos ericoides y en los que la planta debe responder a persistentes periodos de estrés, propios de este tipo de ambientes, ello provoca en el hongo simbiote la constante esporulación como método de sobrevivencia, lo que permite obtener una rizósfera importante como fuente de inóculo. Por otra parte, la prolongada interacción entre el hongo y la planta por largos periodos de tiempo junto a la ausencia de intervención antrópica a través de prácticas agronómicas, permite la persistencia de estos hongos simbiotes. Villegas *et al.*, (2007) realizó una caracterización micorrizogénica en un bosque de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser en el Parque nacional Villarrica en el cual se constató la presencia de este tipo de micorrización ericoide asociada a la especie *Gaultheria pumila*. Mas tarde, estos antecedentes se

confirman con el estudio realizado por Medina (2009) quien evalúa la colonización micorrícica en especies endémicas como *Gaultheria pumila* y *Gaultheria mucronata* presentes en tres ecosistemas naturales de la Región de La Araucanía, y demostró que *G. pumila* presente en el Parque Nacional Villarrica registró el mayor grado de colonización con valores de frecuencia e intensidad de 62,2 y 11,05% respectivamente.

Lo que respecta a la densidad de las esferas, se indica que al utilizar esferas con un 4% de alginato de sodio se obtuvieron mayores valores en la medición de longitud de tallo, diámetro del cuello, peso seco de la raíz y peso seco del tallo de las plantas analizadas, sin embargo estos resultados no concuerdan con los obtenidos en la evaluación de frecuencia e intensidad de colonización micorrízica ericoide, ya que, estos demuestran que al aplicar esferas con tal densidad el porcentaje de colonización fue el mas bajo. Ello se asocia al tiempo que se dispuso entre la aplicación de las esferas y la evaluación, el cual influye en la liberación del inóculo contenido en las esferas. Roumeau, (2001), concluye que la liberación de biomoléculas encapsuladas en esferas de alginato de calcio, dependerá de acuerdo a la concentración de alginato de sodio en cloruro de calcio que se realiza en la reacción.

En consecuencia, la mayor concentración de alginato de sodio utilizada en la elaboración de las esferas permitió una lenta germinación de esporas y liberación de higas del hongo simbionte encapsulado, lo que provocó una colonización baja pero eficiente, lo cual es observable a través del desarrollo de su huésped.

4.4 Esferas de alginato de calcio, efectivo transportador de inóculo micorrícico ericoide.

La efectividad del transportador se evaluó a través del grado de frecuencia e intensidad de colonización micorrícica ericoide y la evaluación de parámetros morfométricos.

Núñez (2003), también confirma la utilización de esferas de alginato de calcio como transportador en la aplicación de inóculos ectomicorrícicos de *Laccaria laccata*, luego de efectuar una correcta micorrización en plántulas de *Nothofagus obliqua*.

Además, Ciampi, *et al.*, (1997) propone que el encapsulamiento celular en la agricultura se ha empleado para la inclusión de células bacterianas para el control biológico de agentes fitopatógenos.

Elaborar esferas de alginato de calcio para la inclusión y transporte de inóculo resultó ser una labor rápida y eficiente, ya que el material utilizado posee características que permiten al investigador su fácil manipulación y dosificación. Por consiguiente, con una dosis de 1,25 g de alginato de sodio, 0,125 g de inóculo, 0,1 g de musgo de turbera y 6,25 g de cloruro de calcio disueltos en 62,5 ml de agua es posible obtener la cantidad de esferas necesarias para inocular 397 plantas, de las cuales el 100% de éstas logró ser colonizada por el hongo simbionte encapsulado. Además, cabe mencionar que de acuerdo a las propiedades naturales que presentan tanto el alginato de sodio, musgo de turbera como el inóculo micorrízico, le confiere a las esferas elaboradas en este estudio la denominación de biofertilizante, el cual puede ser aplicado como una herramienta viable en el desarrollo de sistemas agrícolas sustentables.

Con los resultados obtenidos en esta investigación es posible confirmar lo propuesto por Villena *et al.*, (2009) quienes afirman que las esferas de alginato de calcio poseen cualidades como:

- ✓ Permitir que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente.
- ✓ No requerir solventes orgánicos tóxicos.
- ✓ Permitir una alta velocidad de difusión para macromoléculas, y la posibilidad de controlar dicha difusión.
- ✓ Disolverse y degradarse bajo condiciones ambientales normales.

Batista Filho *et al.*, (1998) proponen que al encapsular un hongo entomopatógeno en esferas de alginato de calcio, permite mejorar su eficacia en condiciones de campo, facilitar la manipulación y la aplicación, tener un producto biodegradable, y aumentar la estabilidad durante el almacenamiento, características con las que se pretende minimizar el costo y la pérdida de las características del producto.

5 CONCLUSIONES

Se elaboraron esferas de alginato de calcio que permitieron la encapsulación y transporte de inóculos micorrícicos ericoides, permitió manipular y dosificar de manera eficiente el inóculo a transportar, además, su elaboración resultó ser un trabajo seguro, rápido y fácil debido a las características que presentan los productos utilizados.

Mediante la utilización de esferas de alginato de calcio como transportador de propágulos se inocularon plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal. La aplicación de estas se caracterizó por ser una labor rápida y expedita, esto debido a las propiedades físicas y químicas que presentan las esferas, lo cual permitió además ser almacenadas y transportadas.

Se evaluó la frecuencia e intensidad de colonización presente en las plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal inoculadas, y se demostró que el tratamiento correspondiente a esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de arándano presentó los mayores índices de colonización, sin embargo, se obtuvieron los valores mas bajos en cuanto a evaluación de parámetros morfométricos, lo cual afirma la baja eficiencia de los hongos simbioses presentes en la rizósfera de un huerto establecido, ya que no refleja los reales beneficios que entrega la asociación micorrícica.

Los resultados obtenidos en la evaluación de parámetros morfométricos indicaron que al inocular plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal a través de esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*, éstas resultaron ser un efectivo y eficiente inoculante ya que presentó la mayor incidencia sobre el crecimiento de las plantas, a pesar de obtener un bajo porcentaje de colonización.

Se demostró que el mayor crecimiento de las plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal fue a través de la aplicación de esferas elaboradas a un 4% de alginato de sodio, sin embargo, éstas presentaron un bajo porcentaje de colonización, lo cual indica que la densidad de las esferas incide en la eficiencia del inóculo transportado.

Las propiedades naturales que presenta el alginato de sodio, el inóculo micorrícico y el musgo de turbera, permitieron elaborar un producto biodegradable con la denominación de biofertilizante, el cual puede ser aplicado como una herramienta viable en el desarrollo de sistemas agrícolas sustentables.

6 RESUMEN

La utilización de biofertilizantes en la producción de arándanos contribuye a la conservación y sustentabilidad del sistema productivo. En el presente trabajo se elaboraron esferas de alginato de calcio con distintas densidades para la encapsulación y transporte de inóculos micorrícicos ericoides. Se evaluaron cuatro tratamientos y un control, estos correspondieron a 0) control; 1) esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum*; 2) esferas de alginato de calcio con raíces de *Vaccinium corymbosum*; 3) esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila* y 4) esferas de alginato de calcio con raíces de *Gaultheria pumila*. Se inocularon plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal, para ello se aplicaron 2 esferas por tratamiento en el sistema radicular de cada plántula. Se diseñaron 2 parcelas de estudio, cada una formada por 100 plantas, divididas en los 4 tratamientos mas control, por lo tanto, 20 repeticiones por tratamiento. Pero, las esferas aplicadas en la parcela uno fueron elaboradas con un 2% de alginato de sodio, y, las esferas de la parcela 2 con un 4%.

Se evaluó la frecuencia e intensidad de colonización, se demostró que el tratamiento correspondiente a esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Vaccinium corymbosum* presentó los mayores índices de colonización, sin embargo, se obtuvieron los valores mas bajos en cuanto a evaluación de parámetros morfométricos, lo cual afirma la baja eficiencia de los hongos simbioses presentes en la rizósfera de un huerto establecido, ya que no refleja los reales beneficios que entrega la asociación micorrícica.

Los resultados obtenidos en la evaluación de parámetros morfométricos indicaron que al inocular plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal a través de esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*, éstas resultaron ser un efectivo y eficiente inoculante ya que presentó la mayor incidencia sobre el crecimiento de las plantas, a pesar de obtener un bajo porcentaje de colonización. Se demostró que el mayor crecimiento de las plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal fue a través de la aplicación de esferas elaboradas a un 4% de alginato de sodio, sin embargo, éstas presentaron un bajo porcentaje de colonización, lo cual indica que la densidad de las esferas incide en la eficiencia del inóculo transportado.

7 SUMMARY

The use of biofertilizers in blueberry production contributes to the conservation and sustainability of the productive system. In the present study were prepared calcium alginate spheres with different densities for the encapsulation and transport of ericoid mycorrhizal inoculum. Four treatments and control, these corresponded to 0) control: 1) calcium alginate spheres with *Vaccinium corymbosum* rhizospheric soil, 2) calcium alginate spheres with *Vaccinium corymbosum* roots, 3) spheres of calcium alginate rhizosphere soil of *Gaultheria pumila* and 4) calcium alginate spheres with roots of *Gaultheria pumila*. Inoculated plants of *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal, for it was applied 2 areas for treatment on the root system of each seedling. 2 were designed study plots, each consisting of 100 plants, divided into 4 treatments more control, therefore, 20 replicates per treatment. But, the areas applied in a plot were made with 2% sodium alginate, and the areas of plot 2 to 4%.

We evaluated the frequency and intensity of colonization, it was shown that treatment for calcium alginate spheres with rhizosphere soil of *Vaccinium corymbosum* showed the highest rates of colonization, however, we obtained the lowest values in terms of assessment of morphometric parameters, which maintains the low efficiency of symbiotic fungi present in the rhizosphere of an established orchard, it does not reflect the actual benefits delivered by the mycorrhizal association.

The results obtained in the evaluation of morphometric parameters indicated that the inoculated plants *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal through calcium alginate spheres with rhizosphere soil of *Gaultheria pumila*, they proved to be an effective and efficient inoculant and presented the greatest impact on plant growth, despite getting a low rate of colonization.

It was shown that increased growth of plants of *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal was through the application of developed areas to a 4% sodium alginate, however, they presented a low percentage of colonization, indicating that the density of the spheres affects the efficiency of inoculum carried.

8 LITERATURA CITADA

Alarcón, A., Almaraz, J., Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, M., Lara, M., Manjarrez, MJ., Quintero, R., y Santamaría, S. (eds). 2001. Tecnología de hongos micorrícicos en la producción de especies forestales en vivero. Colegio de Postgraduados, Montecillo. SEMARNAT-PRONARE. México. 98 p.

Alarcón, A., y Ferrera-Cerrato, R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *TERRA Latinoamericana*. Universidad Autónoma Chapingo. México. 17: 179-191.

Azcon-Bieto, J. y Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología celular. Ediciones Universitarias. Barcelona, España. 522 p.

Batista-Filho, A., S. B. Alves, L. F. A. Alves, R. M. Pereira e N. T Augusto. 1998. Formulação de entomopatógenos. pp 917-957. En: S. B. Alves(Ed). Controle microbiano de insetos (2a ed.). FEALQ. Piracicaba, Brasil.

Beyoda, O. 2005. Revisión de la coevolución de sistemas micorrizas ericoides-*Ericaceae*. Tesis pregrado Biólogo y Microbiólogo. Universidad de Los Andes, Bogotá D.F., Colombia. 83p.

Bonfante-Fasolo, P., G. Berta., and V. Gianizzi-Pearson. 1979. Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the *Ericaceae*. I. Naturally infected hair roots of *Calluna vulgaris* L. Hull. *New Phytologist*, 83: 739-744.

Bonfante-Fasolo, P. 1981. Ultrastructural aspects of endomycorrhizas in the *Ericaceae*. II. Host-endophyte relationships in *Vaccinium myrtillosum* L. *New Phytologist*, 89:219-224.

Borie, F., Rubio, R., Rouanett, J.L., Morales, A., Borie,G., and Rojas, C. 2006. Effects of tillage Systems on soil Characteristics, glomalin and mycorrhizal propagules in a Chilean ultisil. *Soil Till.Res.*88:253-261.

Bustos, J. 2010. Evaluación de los parámetros morfométricos y de colonización micorrízica ericoide en plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. c.v. Legacy) tratadas con diferentes inóculos, Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 69p.

Buzeta, A. 1997. Chile: Berries para el 2000. Fundación Chile. Santiago, Chile. 133 p.

Branzanti, M., Rocca, E., and Pisi, A. 1999. Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9 (2): 103-109.

- Brito, L.** 2001. Extracción de alginato de sodio a partir de *Sargassum vulgare* (Fucales, Phaeophyta). Resumen ampliado IX Congreso Latinoamericano sobre ciencias del mar. San Andrés Isla, Colombia.
- Brundrett, M.** 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473 - 495.
- Brundrett, M. Bougher, N. Dell, B. Grove, T. y Malajczuc, N.** 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research. 374 p.
- Carballo, M.** 1998. Formulación de hongos entomopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 48:1-4.
- Carrillo, R. Godoy, R. y Peredo, H.** 1992. Simbiosis micorrízica en comunidades boscosas del Valle Central en el sur de Chile. *Bosque* 13 (2): 57 – 67.
- Carrillo, R., Rodríguez, M., Rodríguez, J. y Medina, J.** 2009. Evaluación de la colonización micorrízica en plantas de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Duke., cultivadas en un huerto de la Región del Bio Bio. VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Chile.
- Ciampi, L., Bernal, G., Oyarzún, J., Schobitz, R., y Fuentes, R.** 1997. Atrapamiento de células bacterianas en matrices de alginato para econtrol biológico de agentes fitopatógenos. *Acta Microbiológica de Chile* 7: 28-30.
- Davies, F.T., P.V. Olalde, M.J. Alvarado, H.M. Escamilla, R. Ferrera-Cerrato y J.L. Espinosa.** 2000. Alleviating phosphorus stress of chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. “San Luis”) by arbuscular mycorrhizal inoculation. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75(6): 655-661.
- Dixon, K.W.** 2002. Ericoid mycorrhizas in plant communities. In. Sivasithamparam, K., Dixon, K.W and Barrett, R.L. (eds.) *Microorganisms in plant Conservation and Biodiversity*. Kluwer Academic Publishers, New York. pp 227-239.
- Eck, P.** 1986. Blueberry. En: *Handbook of fruit set and development*. Ed Shaul. Monselise by C.R.C Press Inc. 75-85.
- García, F., Reig, J., Ibars, A., Estrelles, E.** 2002. La evolución de la simbiosis micorrízica. *Butll. Soc. Micol. Valenciana* 7: 49-54.
- Gianinazzi, S.** 1991. Vesicular-Arbuscular (endo)-Mycorrhizas: Cellular, biochemical and genetics mycorrhizai roots, *Plants and soil*. 71: 197-209.
- Godoy, R., Romero, R. y Carrillo, R.** 1992. Estatus micotrófico de la flora vascular en bosques de coníferas nativas del sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*. 67:209-220.

- Harley J.L. & Smith S.E.** 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. 483 p.
- Hoffmann, A.** 1991. Flora Silvestre de Chile. Zona Araucana. Editorial Fundación Claudio Gay. Santiago de Chile.
- Honrubia, M., Torres, P., Díaz G. y Cano, A.** 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 p.
- Jeffries P.** 1987. Use of mycorrhizae in agriculture. Critical reviews in Biotechnology 5: 319-357.
- Kerley, S. J. & Read, D. J.** 1995. The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*. XVIII. Chitin degradation by *Hymenoscyphus ericae* and transfer of chitin-nitrogen to the host plant. New Phytol. 131: 369-375.
- Korcak, R.F.** 1998. Nutrition of blueberry and other calcifuges. Horticultural Reviews 10:183-227.
- Kuek, C.** 1991. Production of glucoamylase using *Aspergillus phoenicis* immobilized in calcium alginate beads. Applied Microbiology and Biotechnology 35: 466-470.
- Kuek, C.; Tommerup, I. and Malajczuk, N.** 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. Mycology Research 96 (4): 272-277.
- Kron, K., Judd, W., Stevens, P., Anderberg, A., Crayn, D., Gadek, P., Quinn, C. and Luteyn, J.** 2002. A phylogenetic classification of *Ericaceae*: molecular and morphological evidence. Botanical Review 68: 335-423.
- Lecuona, R. E., B. Papierok y G. Riba.** 1996. Hongos entomopatógenos . pp. 35-60. En: R. E. Lecuona (Ed). Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Editorial Mariano Mas. Buenos Aires, Argentina.
- Lemoine, M., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V.** 1992. Application of endomycorrhizae to commercial production of *Rhododendron* microplants. Agronomía 12: 881-885.
- Lobos, W.** 1990. Plantación de arándanos. Revista Asociación Hortofrutícola. 1(2): 4-10.
- López, L. y Fierro, C.** 2002. La familia de las Ericáceas. Boletín ARBA 12: 85-92.
- Luteyn, J. L. (ed.).** 1995. *Ericaceae* Part II. The Superior-Ovaried Genera (Monotropoideae, Pyroloideae, Rhododendroideae, Vaccinioideae p.p.). Flora Neotropica Monogr. 67: 1-560.
- Luteyn, J. L.** 2002. Diversity, adaptation and endemism in Neotropical *Ericaceae*: Biogeographical patterns in the Vaccinieae. The Botanical Review (Lancaster) 68 (1): 55-87.

- Mabberley, D. J.** 1987. The Plant-Book, a portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press. Cambridge.
- Marks, T. and Kozlowski, T. (ed.)** Ectomycorrhizae: their Ecology and Physiology. Academic Press, Inc., Nueva York. p 383-411.
- Marx, D., J, Ruehle. and D E. Cordell.** 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycor-rhiza. *In* Techniques for Mycorrhizal Research: Methods in Microbiology. Norris JR, D Read, AK Varna eds. London, UK. Academic Press, p. 383-411.
- Medina, J.** 2009. Evaluación de la colonización micorrícica en especies endémicas de la familia *Ericaceae*, *Gaultheria pumila* (L.fil) Middleton y *Gaultheria mucronata* (L.fil) Gaud. Ex Spreng., en tres sectores de la Región de La Araucanía. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 73 p.
- Mikola, P.** 1973. Application of mycorrhizal symbiosis on forestry practice. En G.C. Marks and TT Kozlowski, Editors, Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology, Academic Press, New York. 444 p.
- Muñoz, C. y Moreira, I.** 2002. Prácticas actuales recomendadas para el cultivo de arándanos. Revista Tierra Adentro (Chile). 47: 23-25.
- McHugh, D.J. (ed.)** 1987. Production and utilization of products from commercial seaweeds. *FAO Fish. Tech. Pap.* (288): 189 p.
- Nedovic, V.; Leskosek-Cukalovic, I. and Vunjak-Norvacovic, G.** 1999. Immobilized cell technology (ICT) in beer fermentation – a possibility for environmentally sustainable and cost-effective process. <http://www.rcub.bg.ac.yu/~todorum/tutorials/rad15.html>
- Núñez, R.** 2003. Inoculación ectomicorrícica en roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) mediante esferas de alginato de calcio. Tesis de Ingeniero Forestal, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. 72 p.
- Pereira, R. and Roberts, D.** 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econ. Entomol.* 84(6):1657-1661.
- Perotto, S., Coisson, J., Perugini, I., Cometti, V., and Bonfante, P.** 1997. Production of pectin-degrading enzymes by ericoid mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 135: 151-162.
- Pritts, M. and Hancock, J.** 1992. Highbush Blueberry Production Guide. New York, Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 200 p.
- Pritchett, W.** 1991. Suelos Forestales. Grupo Noriega Editores. Editorial Limusa, México 634 p.

- Plenchette, C., Furlan, V. and Fortin, J.** 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P- fertility. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* 70: 199-209.
- Read, D.** 1996. The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany* 77:365-374.
- Read, D. and Pérez-Moreno, J.** 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475- 492.
- Rehm, S.** 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (3): 281-288.
- Reinhardt, D.** 2007. Programming good relations - development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 10: 98 – 105.
- Rodríguez, E.** 2007. Efecto de la micorrización en plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) var. O'Neal a nivel de vivero, Chile. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 53 p.
- Roumeau, M.** 2001. Evaluación de la degradación de esferas de alginato de calcio utilizadas en la micorrización de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill, producidas en corteza de pino. Tesis Ingeniero Forestal. Universidad de la Frontera, Temuco, Chile. 60 p.
- Salinas, N. y Betancur, J.** 2007. Novedades taxonómicas de las ericáceas del suroccidente de Colombia, Colombia. *Revista Caldasia* 29: 51- 58.
- Selosse, M-A. And Le Tacon, F.** 1998. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Tree* 13(1):15-20.
- Sepúlveda, M.** 2005. Encapsulación de *Beauveria bassiana* en matrices de alginato-quitina y efecto de la temperatura en la producción de conidias. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Chillan, Chile. 21p.
- Sleumer, H. y Hermann, P.M.** 1999. *Ericaceae*. In Correa, M. N. (ed.). *Flora Patagónica*. Colección Científica del INTA, Buenos Aires. Tomo 8 (4): 1-15.
- Straker, C.** 1996. Ericoid mycorrhiza: ecological and host specificity *Mycorrhiza* 6: 215-225.
- Tommerup, I., Kuek, C. and Malajczuk, N.** 1987. Ectomycorrhizal inoculum production and utilization in Australia. In: "Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae"; D.M. Sylvia and L.L. Hung (eds.), pp. 293-295.

Thorvilson, H., Wheeler, D., Bextine, B. and San Francisco, M. 2002. Development of *Beauveria bassiana* formulations and genetically marked strains as a potential biopesticide for imported fire ant control. Southwest. Entomol. 25:19-29.

Vega, A. y Gárciga, M. 2007. Micorrizas en arándanos. Berries de Chile 1(1):16-22.

Vega, A., Gárciga, M., Rodríguez, A., Prat, L. and Mella, J. 2009. Blueberries Mycorrhizal Symbiosis Outside of the Boundaries of Natural Dispersion for Ericaceous Plants in Chile. Acta Horticulturae 810: IX International Vaccinium Symposium.

Vega, A. y Muñoz, C. 1994. Presencia de micorrizas en ericáceas en Chile. Agricultura técnica (Chile) 54 (3): 332-339.

Villegas, J., Carrillo, R., Núñez, P. y Rodríguez, M. 2007. Caracterización micorrizogénica de un bosque de *Nothofagus pumilio* (Poepp. Et Endl.) Krasser en el Parque Nacional Villarrica, Cordillera de los Andes, IX Región, Chile. Documento resumen Congreso Internacional sobre Desarrollo, Medio Ambiente y Recursos Naturales: Sostenibilidad a Múltiples Niveles y Escalas. Volumen III Cochabamba, Bolivia. 1447-1455 p.

Villena, M., Morales, M., Gallardo, V. y Ruiz, M. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos, España. Revista Ars Pharmaceutica 50: 43-50.

9 ANEXOS

Anexo 1. Diseño experimental, plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal inoculadas mediante esferas de alginato de calcio con distintas densidades.

0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
2	2	2	2	2
2	2	2	2	2
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
3	3	3	3	3
3	3	3	3	3
3	3	3	3	3
4	4	4	4	4
4	4	4	4	4
4	4	4	4	4
4	4	4	4	4

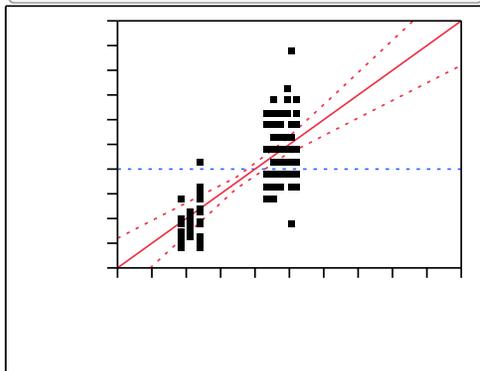
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
2	2	2	2	2
2	2	2	2	2
2	2	2	2	2
3	3	3	3	3
3	3	3	3	3
3	3	3	3	3
3	3	3	3	3
4	4	4	4	4
4	4	4	4	4
4	4	4	4	4
4	4	4	4	4

 esferas de alginato de Ca, 2 % de alginato de sodio

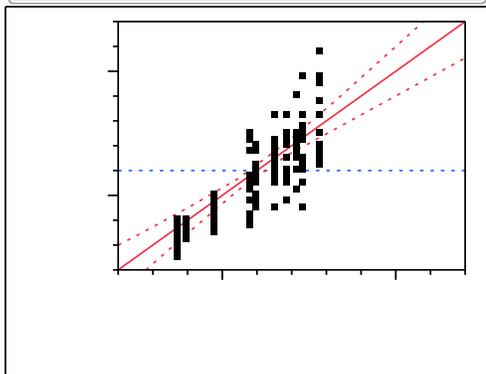
 esferas de alginato de Ca, 4% de alginato de sodio

- 0 esferas de alginato de calcio sin inóculo
- 1 esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de arándano
- 2 esferas de alginato de calcio con raíces de arándano
- 3 esferas de alginato de calcio con suelo rizosférico de *Gaultheria pumila*
- 4 esferas de alginato de calcio con raíces de *Gaultheria pumila*

Anexo 2. Análisis estadístico de longitud de la raíz en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.



Anexo 3. Análisis estadístico de longitud del tallo en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.

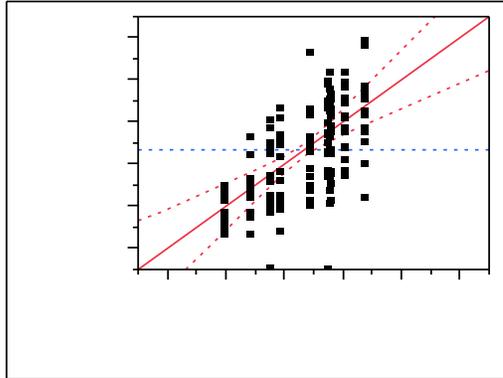


Anexo 4. Análisis estadístico del diámetro del cuello de la raíz en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O`Neal.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



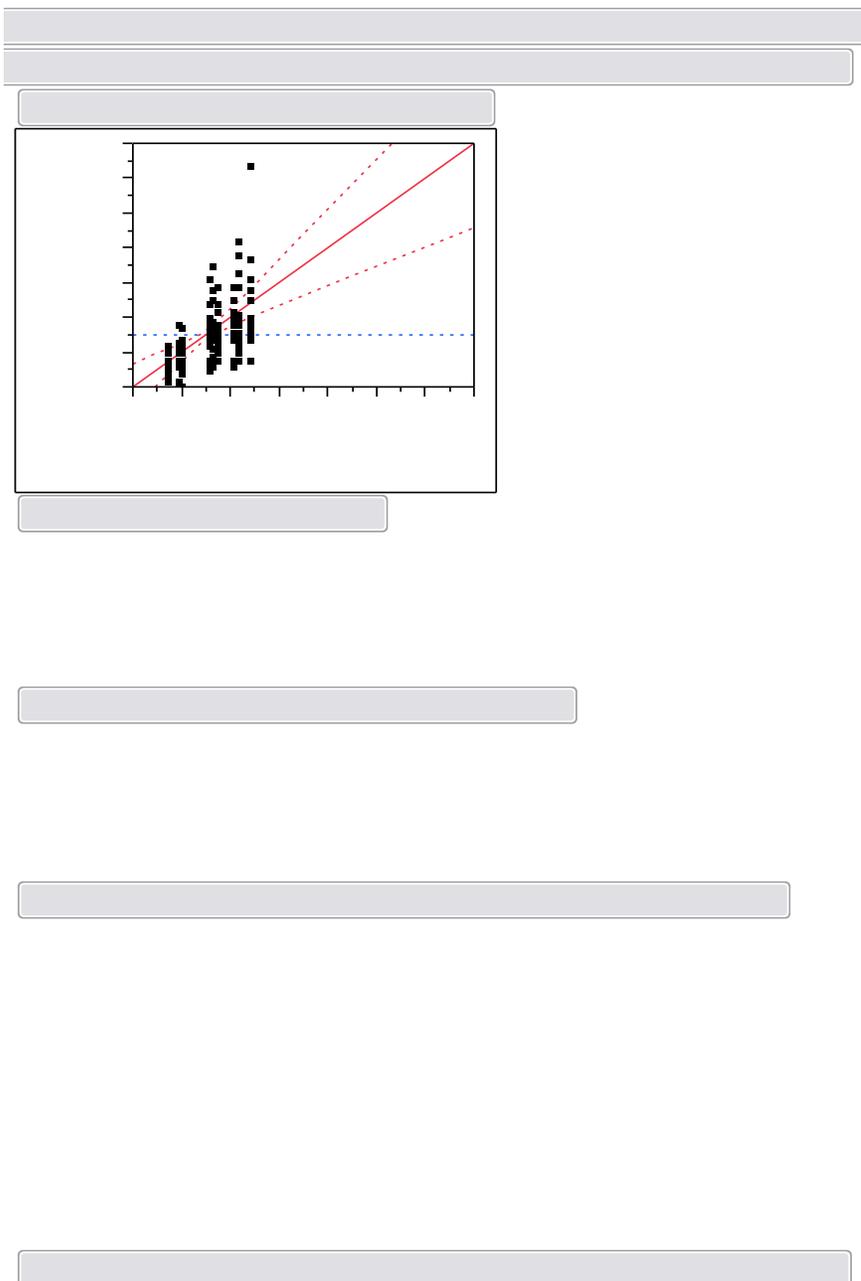
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

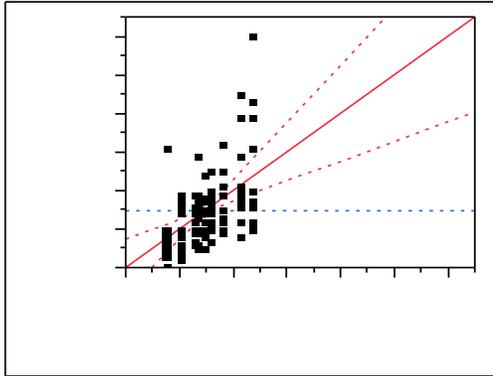
Anexo 5. Análisis estadístico del peso seco de la raíz en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.



Anexo 6. Análisis estadístico del peso seco del tallo en plantas de *Vaccinium corymbosum* var. O'Neal.

[Redacted text]

[Redacted text]



[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

Anexo 7. Formulario para el registro de la colonización endomicorrícica ericoide en el sistema radical de *Vaccinium coymbosum* var. O'Neal. Fecha _____

Nº Punto
1.
2=
3=
4=
5=
6=
7=
8=
9=
10=
11=
12=
13=
14=
15=
16=
17=
18=
19=
20=
150=

Intensidad	
Clase	Descripción
0	Sin colonización
1	Hasta un 5% de colonización
2	6 - 25% de colonización
3	26 - 50% de colonización
4	51 - 75% de colonización
5	76 - 100% de colonización