

VENTAJAS DE LA INOCULACIÓN CON MICORRIZAS EN PLANTINES MICROPROPAGADOS



Alicia Castillo¹, Adriana Montañez²,
Diana Costa², Roberto Docampo³, Danilo Cabrera⁴,
Pablo Rodríguez⁴ y Roberto Zoppolo⁴.

¹Unidad de Biotecnología INIA “Las Brujas”

²Laboratorio de Microbiología de Suelos, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA) Facultad de Ciencias.

³Laboratorio de Suelos INIA “Las Brujas”

⁴Programa Nacional de Producción Frutícola.

EXPERIENCIAS DE MICROPROPAGACIÓN EN HORTIFRUCTICULTURA

El laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Unidad de Biotecnología de INIA “Las Brujas”, ha desarrollado tecnología para la micropropagación de un gran número de especies hortícolas, frutícolas y forestales. Desde los inicios, se trabajó incorporando esta tecnología para la multiplicación de clones avanzados de los programas de mejoramiento, principalmente en el área hortícola. Luego se implementó la multiplicación de las variedades generadas por INIA, como es el caso de la frutilla, papa y otros rubros. En las especies leñosas, como los frutales de hoja caduca, la multiplicación de portainjertos o variedades seleccionadas ha permitido

la incorporación de plantas clonales, producidas por micropropagación en las mismas condiciones, con calidad sanitaria controlada que posteriormente se instalan a campo para ser evaluadas, seleccionándose aquellos que tengan mejor comportamiento en nuestras condiciones de suelo y clima.

ESTRÉS DEL TRASPLANTE

La principal ventaja en la propagación de plantas a partir de cultivos de tejidos es la obtención de plantas en mayores cantidades, en menor tiempo y libres de agentes patógenos como son virus, hongos y plagas. Una vez alcanzado el número de plantas requeridos para los ensayos de evaluación, los plantines producidos en el

laboratorio (*in vitro*) se enraízan y se pasa a la última fase del proceso, que es la aclimatación en el invernáculo. Esta fase es el cuello de botella de todo el proceso de micropropagación, debido a la diferencia de ambientes que representa el crecimiento de plantas *in vitro* comparado con el crecimiento en invernáculo o a campo (*in vivo*).

El éxito final de la propagación *in vitro* depende de la capacidad de transferencia de las plantas fuera del ambiente del laboratorio, a las condiciones de invernáculo con alto porcentaje de sobrevivencia; esto varía de acuerdo a las distintas especies. Las herbáceas tienen una rápida respuesta, en cambio las especies leñosas requieren más tiempo para la adaptación. Las plantas *in vitro* se desarrollan dentro de los recipientes de cultivo con baja intensidad de luz, en condiciones asépticas, en un medio de cultivo que contiene azúcar y nutrientes para permitir el crecimiento heterótrofo y en una atmósfera con una humedad relativa alta. Debido a estas condiciones, las plantas *in vitro* presentan ciertas características que son incompatibles con el desarrollo en el invernáculo o en campo.

La nutrición de las plantas *in vitro* es heterotrófica, esto implica que la planta toma los nutrientes del medio de cultivo (entre ellos está el azúcar) pero no desarrolla fotosíntesis, es decir que no se comporta como un ser autótrofo. Por otro lado, la planta *in vitro* tiene un escaso mecanismo para controlar la pérdida de agua por la escasa funcionalidad de sus estomas, lo que trae como consecuencia que la planta micropropagada esté desbalanceada en su capacidad de absorción y reposición del agua transpirada.

Además, la tasa de transpiración es significativamente más alta en las plantas creciendo *in vitro*, debido a la falta de cera en la cutícula comparada con las plantas que crecen en invernáculo o a campo. El conocimiento de las características fisiológicas y morfológicas de las vitro-plantas es fundamental para definir la estrategia de aclimatación, minimizar las pérdidas y asegurar una alta sobrevivencia en el trasplante.

INOCULACIÓN DE PLANTINES MICROPROPAGADOS

Una herramienta para contrarrestar las pérdidas durante la aclimatación, es la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), técnica que, en general, es poco utilizada en la micropropagación de plantas, desaprovechando la importancia de la simbiosis con microorganismos benéficos.

Los HMA establecen asociaciones simbióticas mutualistas, no específicas, con el 90% de las plantas vasculares. Esta simbiosis mutualista incrementa el crecimiento de las plantas, mediante la optimización en la toma de los nutrientes menos móviles y la protegen frente a estrés de tipo biótico (patógenos de suelo) o abiótico (salinidad, sequía, contaminación por metales pesados, etc).

Desde el punto de vista de la aplicación de HMA en la agricultura, los cultivos frutales leñosos, tales como el manzano, tienen un especial interés, ya que la inoculación no debe ser repetida anualmente evitando costos importantes de producción de inoculante a gran escala. Existen numerosas investigaciones en las que se establece el beneficio que tiene la inoculación de HMA en diversas especies frutícolas con manejo de la micropropagación.

Algunos de ellos están encaminados al estudio de la mejora de la adaptación y desarrollo de las plántulas a condiciones *ex vitro*, como es el caso de frutilla, ananá, vid, kiwi, pera, durazno y cítricos entre otros.

En INIA Las Brujas se desarrolló un trabajo con el objetivo de valorar los beneficios que confiere la inoculación temprana con hongos formadores de micorrizas en portainjertos de manzano como son RN29 y GENEVA®41 durante la fase de aclimatación en el invernáculo. Esta es una de las líneas de trabajo en el marco del Proyecto "Tecnologías, procesos y trazabilidad de la propagación de plantas en los sistemas de producción vegetal intensiva".

Para la micorrización se empleó un solo tipo de inóculo de HMA. La producción del inóculo requiere de la técnica de cultivos trampa donde se utiliza una combinación de soportes estériles y distintas plantas huésped para la multiplicación de los HMA.

La calidad del inoculante se evaluó teniendo en cuenta el número de esporas por gramo de sustrato.



Figura 1 - Colocación del inóculo en la raíz durante el trasplante de portainjerto de manzano.



Figura 2 - Plantas de GENEVA@41 a los 20 días de la aclimatación. 2a: Tratamiento control. 2b: Plantas inoculadas con HMA. 2c: Detalle de las raíces de plantas sin inocular (izquierda) e inoculadas (derecha).

La aplicación del inóculo se realizó en el momento del trasplante, al pasar los plantines enraizados desde los frascos a cajas de plástico con sustrato. Se probaron diferentes sustratos, previamente esterilizados, y se añadió 1 g de inóculo de HMA debajo de la “raíz” de cada plántula (Figura 1).

Los plantines enraizados *in vitro* fueron retirados de los frascos para iniciar la aclimatación en el invernáculo, para ello se transfirieron a recipientes de plástico transparente cerrados de tamaño: 20x15x8cm conteniendo una capa de 2cm de sustrato. En el trasplante del portainjerto GENEVA@41, se usaron tres sustratos: T1) cama de caballo compostada, T2) el sustrato mezcla elaborado en base a ¼ turba Bioland, ¼ arena, ¼ mantillo de pino, ¼ cáscara de arroz, utilizado para cítricos y T3) turba comercial.

Los tres sustratos se esterilizaron en autoclave y se evaluó el efecto de la inoculación respecto al control sin inocular en cada caso, por lo tanto en total se evaluaron 6 tratamientos, con 45 plantas en cada tratamiento con tres repeticiones.

RESULTADOS OBTENIDOS

En la Figura 2 se muestran los resultados del crecimiento de los plantines a los 20 días del trasplante del portainjerto GENEVA@41. Durante ese período, las plantas correspondientes al tratamiento control no crecieron, sin embargo las inoculadas, presentaron mayor expansión de sus hojas y mayor altura. La caja de la izquierda corresponde al tratamiento control (2a), a la derecha, plantas inoculadas con HMA (2b); en tanto en la Figura 2c se muestran las raíces desarrolladas en sustrato con inoculación (planta a la derecha) y sin inoculación (planta de la izquierda).

Se midió la altura de las plantas y hubo diferencia significativa en este parámetro.

Además, las plantas inoculadas desarrollaron mayor masa de raíces (Figura 2c), en un período en el que en general no se observa crecimiento, dado que en las plantas están ocurriendo cambios fisiológicos y metabólicos para poner en marcha el proceso de fotosíntesis y sintetizar su propio azúcar, desde el momento en que se pasa del medio de cultivo a un sustrato que ya no contiene azúcar. También se midió el número de hojas por planta, en los distintos tratamientos y en este parámetro no hubo diferencia estadísticamente significativa (Figura 3).

En las mismas condiciones del ensayo anterior, se evaluó un segundo portainjerto, el RN29. En este caso se incluyeron 200 plantas por tratamiento.

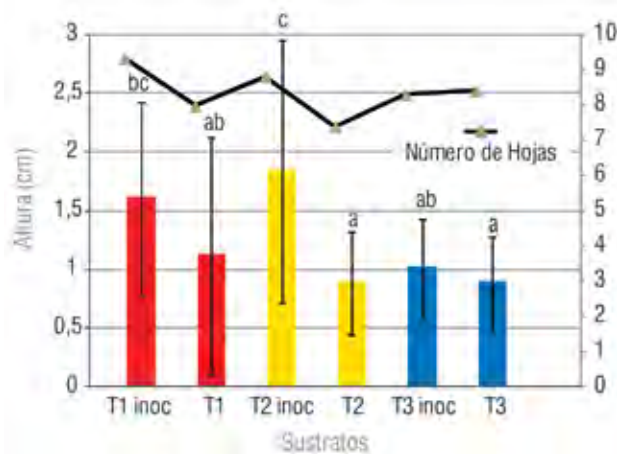


Figura 3 - Parámetros evaluados a los 20 días de la aclimatación. En el eje principal, se representa la altura de planta del portainjerto GENEVA@41. Se evaluaron tres sustratos, T1, T2 y T3, a la izquierda inoculado y a la derecha sin inocular. En el eje secundario se graficó el número de hojas promedio por tratamiento.



Figura 4 - Desarrollo de raíces en plantas de RN29 a los 40 días de aclimatación. De izquierda a derecha: T1 inoculado, T1 sin inocular, T2 inoculado y T2 sin inocular.

Los resultados mostraron la misma tendencia, se observó un crecimiento vegetativo significativamente mayor de las plantas inoculadas comparadas con el tratamiento control. En la Figura 4 se muestra el desarrollo de raíces a los 40 días del trasplante. La inoculación con HMA provocó un abundante crecimiento radicular, que trajo como consecuencia un aumento en los parámetros vegetativos, como altura y diámetro de planta y desarrollo de hojas. Estos resultados representan la reducción del período de aclimatación de 60 a 40 días en el invernáculo.

El tamaño de la planta a los 40 días, fue en promedio superior a 10cm en el tratamiento inoculado de cama de caballo (T1inoc), mientras que el control fue alrededor de 6cm (T1). En la turba comercial inoculada (T2inoc), las plantas prácticamente duplicaron el tamaño respecto al tratamiento control (T2) (Figura 5).

DESAFÍOS Y PERSPECTIVAS EN LA APLICACIÓN DE HMA

Como se ha mostrado en los resultados obtenidos, la aplicación de los HMA está plenamente justificada por sus efectos benéficos en aspectos relacionados con su capacidad como biorreguladores del crecimiento, biofertilizantes y agentes de biocontrol.

Sin embargo, el principal reto está dirigido al manejo de estos hongos con el fin de producir inoculante de

calidad, en cantidad suficiente, con el objetivo de abastecer de manera comercial a los productores, al tiempo de asegurar la limpieza de los inoculantes de microorganismos patógenos. Los factores relacionados a las características biológicas y químicas del suelo inciden fundamentalmente en la actividad de los HMA.

Por otra parte, la diversidad funcional de los HMA podría depender de las especies fúngicas y su procedencia lo cual hace pensar que consorcios de HMA aislados de cultivos ya establecidos adaptados a las condiciones de suelo y clima específicas de nuestro país, podrían ser más eficaces.

Aún cuando los hongos micorrícicos no presentan problemas por especificidad hacia sus hospedantes, se debe buscar la mejor interacción entre hongo-planta, algunas especies fúngicas pueden tener mayor afinidad al compararse con varios hospedantes o incluso entre individuos de la misma especie. Una de las necesidades actuales que se aprecian en la fruticultura nacional es la realización de investigaciones respecto al uso de estos hongos simbióticos en frutales nativos con alto potencial de explotación, así como en aquellos con posibilidad de introducción para nuestro país.

Estas investigaciones pueden desarrollarse tanto *in situ* como en condiciones de laboratorio e invernáculo. Con el uso de esta biotecnología se puede contribuir en el manejo de los sistemas de propagación y producción de plantas en vivero, de forma tal que mejore la sustentabilidad de estos sistemas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones es razonable promover la introducción de esta práctica en los viveros de producción vegetal, ya que la micorrización temprana de cualquier planta, y entre ellas la de manzano, con una relativamente alta "dependencia micorrítica" confiere un beneficio inicial importante que se traducirá en una considerable mejora con respecto al manejo convencional de multiplicación de plantas.

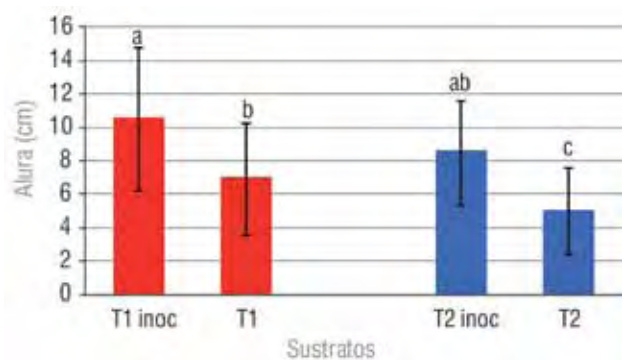


Figura 5 - Altura Promedio de las plantas de RN29 a los 40 días evaluadas en dos sustratos: T1 inoc. cama de caballo compostada, inoculada y sin inocular (T1) y T2 inoc., turba comercial, inoculada y sin inocular (T2).