

UCH-FC
MAG-B
D687
C-1

RELACIONES MUTUALISTAS

ENTRE

Trichoderma harzianum R. (Moniliaceae)

Y

Triticum aestivum L. (Poaceae):

EL EFECTO MODULADOR

DEL ESTRÉS HÍDRICO.

Tesis

Entrega a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología

Facultad de Ciencias

Por

Eduardo Patricio Donoso Cuevas

Septiembre, 2005

Director de Tesis: Dr. Ramiro Bustamante.
Dra. Margarita Carú.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

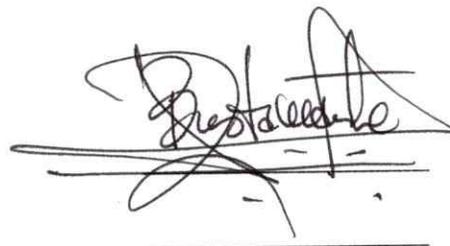
EDUARDO PATRICIO DONOSO CUEVAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Ecología, en el exámen de Defensa de Tesis, rendido el día 4 de enero de 2006

Directores de Tesis:

Dr . Ramiro Bustamante

Dra. Margarita Carú



Comisión de evaluación de la tesis:

Dr. Hermann Niemeyer (Presidente)

Dr. Italo Serey



DEDICATORIA

Dedicado a Nadia.



AGRADECIMIENTOS

En este trabajo debo agradecer a los profesores del programa, Ramiro Bustamante, Margarita Caru y Hermann Niemeyer, por su constante apoyo. A Bio Insumos Nativa, por el financiamiento de la tesis y al Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca, por la facilitación de sus instalaciones.



-Índice de Materias	Página
Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
Interacción <i>Trichoderma</i> - planta	3
Interacciones planta – hongo: el caso de <i>T. harzianum</i> y <i>T. aestivum</i> .	5
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y METODOS	9
RESULTADOS	14
Efectos sobre la planta.	14
Efectos sobre el hongo.	15
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS	24
ANEXO I Cálculo Regimenes de Riego	35

-Índice de Tablas	
Tabla	Página
Tabla 1, Especies de plantas en las que se ha reportado estimulación de crecimiento, por <i>Trichoderma</i> spp.	4
Tabla 2 Evaporación de Bandeja (Eb), en mm., para las distintas fases del cultivo de <i>Triticum</i> , bajo condiciones con y sin estrés hídrico.	37
Tabla 3. Coeficiente de cultivo referencial (kc)	37
-Índice de Figuras	
Figura	Página
Figura 1. Volumen de las raíces (en ml) de <i>Triticum aestivum</i> var. Alifén, en respuesta a tratamientos con presencia/ausencia de estrés hídrico y la presencia/ausencia de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule.	17
Figura 2. Biomasa seca (g) de <i>Triticum aestivum</i> var. Alifén, en respuesta a tratamientos con presencia/ausencia de estrés hídrico y la presencia/ausencia de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule.	18
Figura 3. Fecundidad, expresada como número de semillas/planta de <i>Triticum aestivum</i> var. Alifén, en respuesta a tratamientos con presencia/ausencia de estrés hídrico y la presencia/ausencia de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule.	19
Figura 4. Tasa de crecimiento (r) de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule, en respuesta a tratamientos con presencia /ausencia de plantas de <i>Triticum aestivum</i> var. Alifén y ausencia/presencia de estrés hídrico.	20
Figura 5. Población de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Queule expresado como logaritmo de unidades formadoras de colonias/g de suelo, en presencia/ausencia de <i>Triticum aestivum</i> var. Alifén, bajo dos condiciones de disponibilidad de agua, presencia (A) y ausencia (B) de estrés hídrico.	21

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la existencia de interacciones mutualistas entre el hongo *Trichoderma harzianum* Rifai (Moniliaceae) y *Triticum aestivum* Lineo (Poaceae) y cómo el estrés hídrico puede modular la magnitud y signo de esta interacción. Se cultivaron plantas de trigo var. Alifén bajo condiciones de ausencia/presencia de estrés hídrico y ausencia/presencia de *T. harzianum*; se midió el volumen de raíces, la biomasa seca y la fecundidad de la planta y se estimó el tamaño poblacional y tasa de crecimiento poblacional del hongo.

Sólo las plantas bajo condiciones de estrés hídrico mostraron un efecto positivo significativo ante la presencia de *T. harzianum*. Por ejemplo, la fecundidad del trigo (número semillas/planta) fue significativamente menor sin hongos que en presencia de hongos. Por su parte, el hongo mostró la mayor tasa de crecimiento poblacional en presencia de trigo y bajo condiciones de estrés en comparación con la condición de estrés y sin plantas. Estos resultados corroboran el planteamiento general que las interacciones mutualistas deberían expresarse con mayor fuerza bajo condiciones de estrés.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the mutualistic interactions between *Trichoderma harzianum* R. (Moniliaceae) and *Triticum aestivum* L.(Poaceae) and to what extent hydric stress modulated the magnitude and sign of this ecological interaction. Wheat, was cultivated under the presence/absence of hydric stress and under the presence/absence of fungus; Response variables in wheat were root volume, dry biomass, and fecundity while population size and growth rate was evaluated for the fungus.

Only plants submitted to hydric stress, showed a significant positive effect of the presence of *T. harzianum*. For example, the fecundity of wheat (number of seeds/individual plant) significantly decreased in the absence of the fungus. On the other hand, the fungus reached its highest population growth rate in the presence of wheat and under hydric stress. These results confirm the general assertion that mutualistic interactions are context-dependent and that they will occur with more strength under stress conditions.

INTRODUCCIÓN

Los mutualismos se definen como aquellas interacciones biológicas que incrementan la adecuación biológica de las especies interactuantes (Begon *et al.* 1999). En esta interacción, los organismos pueden mejorar la obtención de recursos, la dispersión de los individuos, o bien la protección frente a depredadores (Boucher 1985, Begon *et al.* 1999, Vandermeer & Boucher 1978). La existencia de mutualismos tiene consecuencias importantes que afectan las dinámicas poblacionales de las especies interactuantes y son factores claves en la estructuración de las comunidades naturales (Begon *et al.* 1999).

Para la comprensión de los mutualismos no basta con evaluar sólo la adecuación biológica de los organismos. El contexto ecológico en que estas interacciones ocurren (biótico/abiótico) condicionaría la intensidad e incluso el signo de ella (Price 1986). Se han desarrollado modelos conceptuales, con el objetivo de predecir cómo las interacciones cambian de signo, cuando están sometidos a gradientes de productividad y/o disponibilidad de recursos (Maestre, 2005). Sin embargo, los pocos estudios sobre la naturaleza condicional de las interacciones, han estado centrados en parasitismo y depredación (Schall 1992) y sólo en años más recientes, se ha estudiado el caso del mutualismo (Cushman & Whitham 1989, Breton & Addicot 1992). Así, en modelos de facilitación planta-planta, el grado de estrés como modulador del signo e intensidad de estas interacciones ha sido modelado por varios

autores (Bertness & Callaway 1994, Callaway *et al.* 2002), aunque son escasos los experimentos de laboratorio y de campo que ponen a prueba estos modelos (Maestre *et al.* 2005).

El ejemplo clásico de mutualismos entre plantas y hongos, es el caso de las asociaciones con endo y ecto micorrizas . En las ectomicorrizas las hifas fúngicas penetran a través de los espacios intercelulares de la epidermis sin invadir las células y forman una vaina externa; en las endomicorrizas el hongo invade las células de la raíz. Producto de esta interacción, la planta aumenta la absorción de nitrógeno (Plassard *et al.*, 1991), de fósforo (Mousain *et al.* 1997) y de agua (Joffre 1988). En otros casos, las micorrizas favorecen a las plantas pues aumentan su tolerancia a la salinidad del suelo, permitiéndoles así aumentar su área de dispersión (Poss & Jarrel 1985, Ruiz-Lozano *et al.* 1997). Por su parte, el hongo se beneficia captando nutrientes de las células radiculares.

Interacción *Trichoderma* – planta.

Otros hongos que establecen interacciones mutualistas con plantas son los pertenecientes al género *Trichoderma*, destacando *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae), un habitante común del suelo, con una distribución cosmopolita, saprófito y capaz de colonizar la rizósfera (Harman 2003). Además de los innumerables reportes como controlador biológico de fitopatógenos, se ha documentado que este hongo es capaz de generar efectos benéficos directos en la planta, tales como, aumento en la capacidad de exploración de las raíces, aumento en biomasa (Björkman *et al.* 1998, Blanchard & Björkman 1996), mayor largo de brote y área foliar (Altomare *et al.* 1999; Blanchard & Björkman 1996), incremento en la producción de frutos y mayor tolerancia al estrés hídrico y a la baja radiación fotosintéticamente activa (Rabeendran *et al.*, 2000).

Todos estos efectos positivos inciden directamente sobre el éxito reproductivo de la planta. Los mecanismos por los cuales *Trichoderma* logra este aumento del vigor de las plantas aún no están del todo claros (Altomare *et al.* 1999, Björkman *et al.*, 1998, Harman 2003). En la tabla 1 se nombran algunas de las especies en las que se ha documentado una estimulación del crecimiento por efecto de *Trichoderma* spp.

Tabla 1, Especies de plantas en las que se ha reportado estimulación de crecimiento por *Trichoderma* spp.

Espece	Efecto Especifico	Autores
<i>Lycopersicum esculentum</i> (Tomate)	Aumento en largo y peso de raíces y peso de frutos.	Windham <i>et al.</i> 1986
<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco)	Aumento de masa radicular y largo de brote.	Kleifeld & Chet 1992
<i>Cucurbita maxima</i> (Zapallo)		
<i>Petunia hybrida</i> (Petunia)	Aumento de la relación brote/raíz.	Ousley <i>et al.</i> 1993
<i>Zea mays</i> (Maíz)	Aumento en tamaño de raíces y brotes.	Blanchard & Björkman 1996; Björkman <i>et al.</i> 1998.
<i>Capsicum annum</i> (Pimentón)	Mayor volumen de raíces y peso de frutos.	Björkman <i>et al.</i> 1998
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Porotos)	Aumento de peso seco de raíces y largo de brotes.	Björkman <i>et al.</i> 1998
<i>Tuberum suberosum</i> (Papas)	Aumento del área foliar y del rendimiento.	Harman & Björkman 1998
<i>Chrysanthemum indicum</i> (Crisantemo)	Incremento en largo de vara y peso fresco de raíces.	Mackenzie <i>et al.</i> 2000
<i>Lactuca sativa</i> (lechuga)	Aumento de peso seco de raíces, peso fresco y área foliar.	Lynch <i>et al.</i> 1991 Baker 1988 Ousley <i>et al.</i> 1994 Rabeendran <i>et al.</i> 2000
<i>Brassica oleracea</i> (Repollo)	Incremento del área foliar y peso seco de brotes y raíces	Rabeendran 2000 Ousley <i>et al.</i> 1994
<i>Pisum sativum</i> (Arveja)	Aumento de peso y largo de raíces y peso fresco de brotes.	Naseby <i>et al.</i> 2000
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	Aumento de la masa radicular y largo de entrenudos.	Duffy & Simond 1996

Interacciones planta – hongo: el caso de *T. harzianum* y trigo

Es ampliamente conocido que *T. harzianum* y trigo (*Triticum aestivum*) establecen interacciones de facilitación. Por ejemplo, *Trichoderma* actúa controlando algunos patógenos de la planta (Perello *et al.* 2003, Duffy & Simond 1996, Perello *et al.* 2003). Por otro lado, *Trichoderma* también es capaz de estimular el crecimiento de ella (Duffy *et al.* 1996). Se ha documentado también que *Trichoderma* incrementa el largo de raíces, la biomasa total y la producción de semillas, probablemente como una consecuencia del mejoramiento de la absorción de fósforo y nitrógeno (Gupta 2001, Behl *et al.* 2003).

El sistema biológico conformado por *T. harzianum* y trigo es un muy buen modelo para explorar la naturaleza de las interacciones mutualistas, así como para analizar el rol modulador del ambiente abiótico. En este escenario ecológico, es posible suponer que los efectos positivos de los microorganismos sobre el trigo van a ser más intensos bajo condiciones de estrés hídrico, si es que estos efectos hacen a esta especie temporalmente más eficiente en el uso de los recursos hídricos. De hecho, pese a existir evidencias indicando que *Trichoderma* es capaz de estimular el crecimiento del trigo (Duffy *et al.* 1996), estudios con otras especies sugieren que este efecto estimulador sería mediado por condiciones ambientales estresantes para la planta. En efecto, cuando las condiciones de estrés para la planta desaparecen, la estimulación

de crecimiento declina en intensidad, incluso dejando de existir diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* (Rabeendran *et al.* 2000, Harman & Björkman 1998, Harman 2000, Chang *et al.* 1986, Inbar *et al.* 1994, Windham *et al.* 1986).

El conocer si el estrés hídrico ejerce un rol modulador sobre el desempeño biológico de una planta de interés económico como *T. aestivum*, es una tarea importante en un escenario de cambio global; se espera que las mayores fuentes de estrés para las plantas provengan de limitaciones crecientes, en la disponibilidad de agua, en especial en áreas áridas y semi-áridas (Mueller *et al.* 2005, Hanson & Weltzin 2000), lo que tendría graves consecuencias en el secano interior de Chile donde el cultivo de trigo se realiza sin riego artificial, ya que el estrés hídrico puede reducir el vigor de las plantas y la producción de semillas. En efecto, mientras un cultivo bajo riego es capaz de producir sobre las 100 ton/ha, un cultivo sin riego sólo llega a las 30 ton/ha. (Mellado & Madariaga, 1992).

De acuerdo a lo propuesto en esta tesis, la asociación que establezca *Trichoderma* con el trigo permitiría mantener una actividad agrícola incluso bajo escenarios de creciente estrés hídrico.

Los objetivos del presente estudio fueron: examinar experimentalmente la existencia de interacciones mutualistas entre *T. harzianum* y *T. aestivum* y evaluar el rol modulador del estrés hídrico sobre la intensidad y magnitud de la interacción entre *T. harzianum* y *T. aestivum*.

Hipótesis.

Si *Trichoderma harzianum* y *Triticum aestivum* establecen una interacción mutualista, entonces (i) el desempeño de plantas inoculadas con hongos (evaluado por biomasa, y fecundidad) será significativamente mayor que el de plantas no inoculadas, (ii) la tasa de crecimiento poblacional de este hongo será mayor en presencia de *Triticum aestivum*, y (iii) el estrés hídrico intensificará la interacción mutualista entre *Triticum aestivum* y *Trichoderma harzianum*, y los efectos positivos mutuos serán comparativamente mayores bajo una condición de estrés hídrico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia, de efectos mutualistas entre *Trichoderma harzianum* R. y *Triticum aestivum* L. su magnitud y el signo en función de la disponibilidad de agua.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-. Evaluar los efectos de *Trichoderma harzianum* sobre *Triticum aestivum*, bajo dos condiciones contrastantes de disponibilidad de agua, a través de parámetros de vigor como biomasa y volumen de raíces y parámetros reproductivos como fecundidad.
- 2-. Evaluar los efectos de *T. aestivum* sobre *T. harzianum*, bajo condiciones contrastantes de disponibilidad de agua, a través de la tasa de crecimiento poblacional.

MATERIALES Y METODOS

Las semillas de trigo (*T. aestivum*) var. Alifén, fueron suministradas por Hermann Niemeyer, del Laboratorio de Química Ecológica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Las plantas de este estudio se obtuvieron por germinación de las semillas en tubos de polietileno (Termomatrices ®, Santiago Chile) de 125 ml de capacidad con un sustrato estéril (autoclavado a 121° C, por 30 min., dos veces separadas por 12 horas), compuesto por compost, arena y turba (1:1:1) en el que se sembró una semilla de trigo por tubo.

Para los inóculos del hongo se utilizó la cepa Queule de *Trichoderma harzianum*, asilada de la Reserva Nacional Los Queules (altitud 503 m.s.n.m. 35° 59'10,5" S 72° 41'35,9" W) la cual está depositada en la colección del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Talca. Se cultivó el hongo en una mezcla de cereales estériles, que después de la inoculación se dispusieron a 25° C por 5 días, diez g de estos granos, cubiertos de conidias maduras de *Trichoderma*, se colocaron en 1 l de agua estéril y en agitación a 250 r.p.m. por 30 min, luego de lo cual se extrajo una muestra para conteo en cámara de Neubauer. Finalmente se ajustó la suspensión a una concentración de 10⁸ conidias/ml, mediante diluciones seriadas. El medio selectivo para *Trichoderma* (TSM) está compuesto por (g/l): Ca(NO₃)₂ – 1,0; KNO₃ – 0,26; MgSO₄ 7H₂O – 0,26; KH₂PO₄ – 0,12; CaCl₂ 2H₂O – 1; ácido cítrico – 0,05; sucrosa – 2,0; agar-

20,0; Flint 50% WG (Trifloxystrobin, Bayer Alemania) -1;0; clortetraciclina – 0,005; captan 80% WG (Captan, Arvesta Corporation USA) – 0.004; Previcur N (Propamocarb HCl, Aventis Crop Science Alemania) – 0,0025. (Modificación del medio de Smith *et al.* 1990).

Se realizaron experimentos de laboratorio para cuantificar los efectos mutualistas entre *Trichoderma harzianum* cepa Queule y trigo bajo dos condiciones de disponibilidad de agua contrastantes.

Se realizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 2 donde los factores fueron presencia/ausencia del hongo y presencia/ausencia de estrés hídrico. Cada tratamiento constó de 27 repeticiones (n muestral = 108 réplicas). En los tratamientos con hongo se aplicó una suspensión de conidias, a una concentración de 1×10^8 conidias/ml, en una dosis de 10 ml por tubo, dando una concentración final de $2,5 \times 10^6$ conidias/g. de suelo. Esta aplicación se realizó inmediatamente después de la siembra del trigo.

Para generar las condiciones contrastantes de disponibilidad de agua, se usó la metodología utilizada por Opazo (1999), quien determinó variedades de trigo resistentes a estrés hídrico. Así, durante el período comprendido entre la siembra y la primera hoja verdadera, todos los tratamientos tuvieron el mismo régimen de riego, el que consistió en riego a capacidad de campo cada vez que la humedad aprovechable en el suelo disminuyó en un 40% (ver anexo I). A

partir de la primera hoja, los tratamientos sin estrés continuaron con el régimen ya descrito, mientras que los sometidos a estrés, fueron regados a capacidad de campo cada vez que la humedad aprovechable del suelo disminuyó un 80%. Los distintos regímenes de riego se suplieron con sistemas independientes de irrigación que entregaban la cantidad de agua necesaria a cada planta en forma individual. Para la realización de los riegos, se utilizó una bandeja de evaporación, modificada para invernadero, la que entregaba la cantidad de agua evaporada por días, utilizando los coeficientes estándar de trigo. Se calculó la evapotranspiración de la planta, lo que asociado a la capacidad de estanque del suelo, indicó el consumo de la humedad aprovechable, determinando de esta forma los momentos de riego, tanto para la condición con estrés como sin estrés (Ver Anexo I).

Los datos de biomasa fueron ajustados $\ln(x + 1)$ para obtener varianzas homogéneas y posteriormente fueron sometidos a un ANDEVA de dos vías (Sokal & Rohlf 1995) y luego a una prueba *a posteriori* para muestras desiguales, debido a que al finalizar el experimento, en algunos tratamientos se redujo el tamaño de las muestras debido a un único ataque de mirlos (obs. pers.).

En el estado de madurez fisiológica de semillas, es decir cuando las semillas alcanzan viabilidad germinativa, se midió para cada planta la biomasa seca total, la biomasa aérea y radicular y fecundidad expresada como número de

semillas por planta. El volumen radicular fue estimado indirectamente a través de la inmersión de las raíces en una probeta con agua, midiendo luego el volumen de agua desplazado.

Para evaluar el efecto de trigo sobre *Trichoderma*, se diseñaron los siguientes tratamientos: T₁: trigo sin estrés hídrico, T₂: trigo con estrés hídrico, T₃: sin planta y con estrés hídrico T₄: sin planta y sin estrés hídrico. Este es un diseño estadístico completamente al azar, con arreglo factorial 2x2, donde los factores son planta (trigo y sin planta) y nivel de estrés (con y sin). Cada 15 días se tomaron muestras de 1 g de suelo, de 5 tubos, cada uno correspondiente a una repetición, para determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo, como una medida del tamaño poblacional del hongo. La UFC incluye las unidades vegetativas (trozos de micelio), las unidades reproductivas (conidias) y las unidades de resistencia (clamidosporas). El tamaño poblacional se obtuvo simplemente sumando estos tres tipos de estructuras. Las muestras de suelo se disolvieron en 200 ml de agua estéril, se agitaron a 150 r.p.m. por 30 min, y se sometieron a diluciones seriadas hasta 1:1.000 de. De dichas muestras se extrajeron 500 µl, los que fueron sembrados en placas Petri (Phoenix, USA) de 8.5 cm de diámetro, con el medio de cultivo TSM descrito anteriormente. Las placas fueron puestas en incubación a 25° C por 7 días, antes de contar las UFC. Los datos fueron sometidos a un ajuste logarítmico [log (x+1)] para obtener varianzas homogéneas, luego se estimó el parámetro poblacional λ , basándose en la fórmula $\lambda = \text{población final/población inicial}$, y

finalmemnte de acuerdo con éste la tasa intrínseca de crecimiento r , y , posteriormente sometidos a un ANDEVA y a una prueba *a posteriori* de Tukey HSD.

RESULTADOS

Efectos sobre la planta

El volumen de las raíces se incrementó significativamente en presencia de hongos (ANOVA: $F_{1,91} = 13,53$; $P = 0,0004$); no se observaron efectos del estrés (ANOVA: $F_{1,91} = 1,61$; $P = 0,21$) se detectó una interacción significativa entre ambos factores (ANOVA: $F_{1,91} = 6,21$; $P = 0,01$). Concordante con lo anterior hubo diferencias significativas sólo bajo la condición de estrés (Tukey HSD, $P < 0,01$), siendo el tratamiento sin presencia del hongo y bajo condiciones de estrés el que mostró un volumen de raíces significativamente menor que el tratamientos con presencia de *Trichoderma* y estrés y que los tratamientos sin estrés. Estos tres tratamientos no difirieron entre si (Figura 1).

La biomasa seca total de las plantas, no fue afectada por la presencia del hongo (ANOVA: $F_{1,91} = 1,72$; $P = 0,19$); ni por la interacción entre ambos factores (ANOVA: $F_{1,91} = 0,40$; $P = 0,525$) (Figura 2), pero si por el estrés hídrico (ANOVA: $F_{1,91} = 67,00$; $P = 0,001$).

El numero de semillas por planta se incrementó significativamente en presencia de hongos (ANOVA: $F_{1,91} = 9,39$; $P = 0,003$); no se encontraron diferencias significativas debidas al estrés hídrico (ANOVA: $F_{1,91} = 2,99$; $P = 0,086$) y se detectó una interacción entre ambos factores (ANOVA: $F_{1,91} = 4,46$; $P = 0,04$). Al igual que en el caso de volumen de las raices, que existen diferencias significativas sólo bajo la condición de estrés (Tukey HSD, $P < 0,04$), siendo el

tratamiento sin presencia del hongo y bajo condiciones de estrés el que mostró una fecundidad menor que las obtenidas en los tratamientos con presencia del hongo y de estrés y que los tratamientos sin estrés. Estos últimos tratamientos no difirieron entre sí (Figura 3).

Efectos sobre el hongo

La tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r) del hongo no varió a causa del estrés hídrico (ANOVA: $F_{1,16} = 0,1$; $P = 0,754$); esta tasa se incrementó significativamente en presencia de plantas del trigo (ANOVA: $F_{1,16} = 77,05$; $P = 0,00001$) y se detectó una interacción significativa entre ambos factores (ANOVA: $F_{1,16} = 16,27$; $P = 0,0009$). Al analizar cada uno de los tratamientos, se observa que hubo diferencias significativas sólo en presencia de plantas (Tukey HSD, $P < 0,0001$), siendo el tratamiento con presencia de planta y bajo condiciones de estrés el que mostró una tasa de crecimiento (r) significativamente mayor que la alcanzada en presencia de plantas pero sin la condición de estrés hídrico. A su vez, ésta fue significativamente mayor que la encontrada en los tratamientos sin presencia de planta, independiente de la existencia de estrés hídrico, no existiendo diferencias entre estos últimos tratamientos (Figura 4).

El tamaño poblacional del hongo (evaluado como unidades formadoras de colonia/g de suelo) se incrementó significativamente en presencia de plantas (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,16} = 48,87$; $P = 0,000003$); no se detectaron

diferencias significativas a causa del estrés hídrico (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,16} = 0,707$; $P = 0,413$) y se detectó un efecto significativo de la interacción entre presencia de plantas y presencia /ausencia de estrés hídrico (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,16} = 5,148$; $P = 0,000003$) (Figura 5).

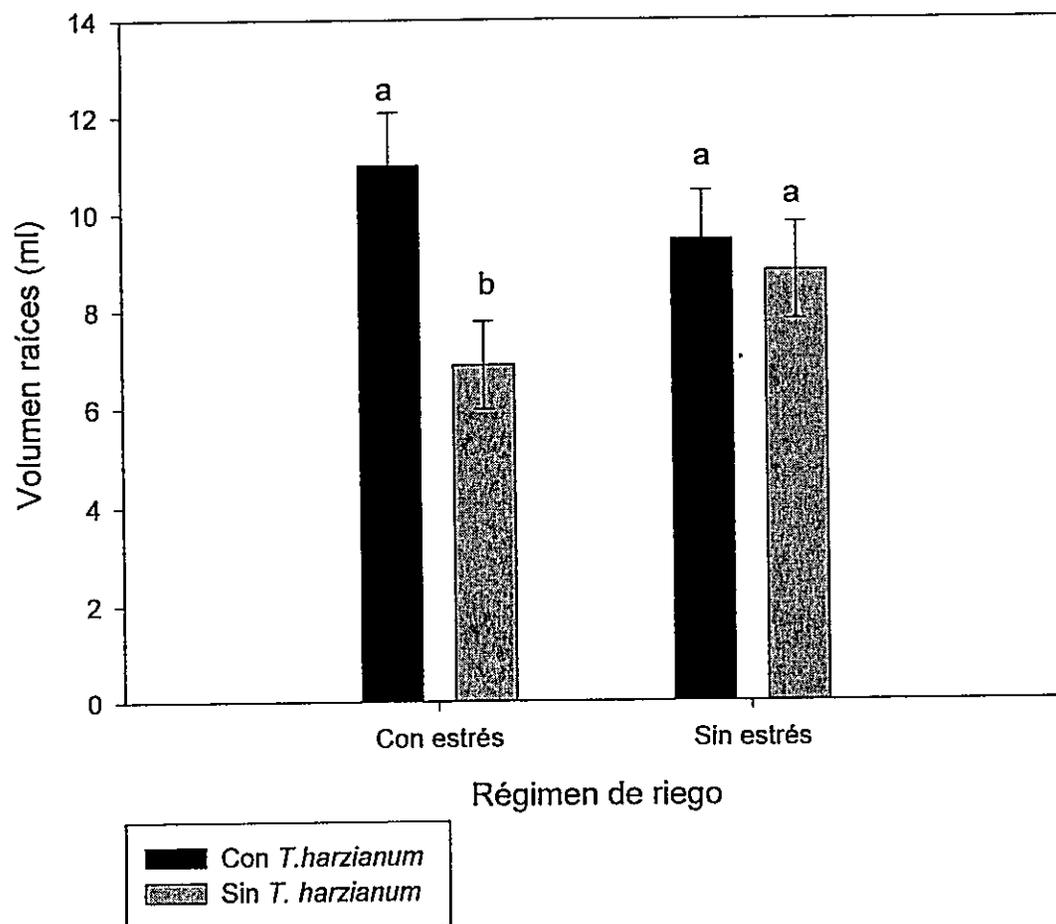


Figura 1. Volumen de las raíces (en ml) de *Triticum aestivum* var. Alifén, en respuesta a tratamientos con presencia/ausencia de estrés hídrico y la presencia/ausencia de *Trichoderma harzianum* cepa Queule.

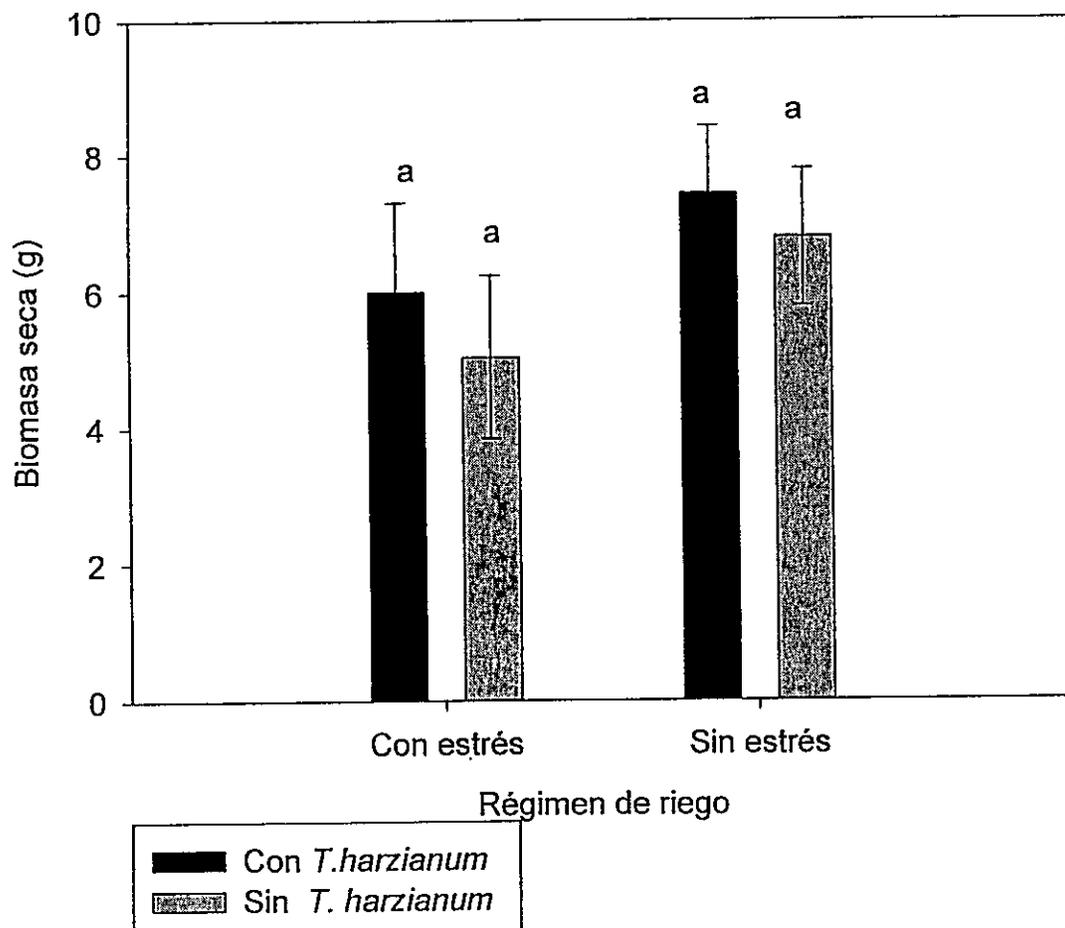


Figura 2. Biomasa seca (g) de *Triticum aestivum* var. Alifén, en respuesta a tratamientos con presencia/ausencia de estrés hídrico y la presencia/ausencia de *Trichoderma harzianum* cepa Queule.

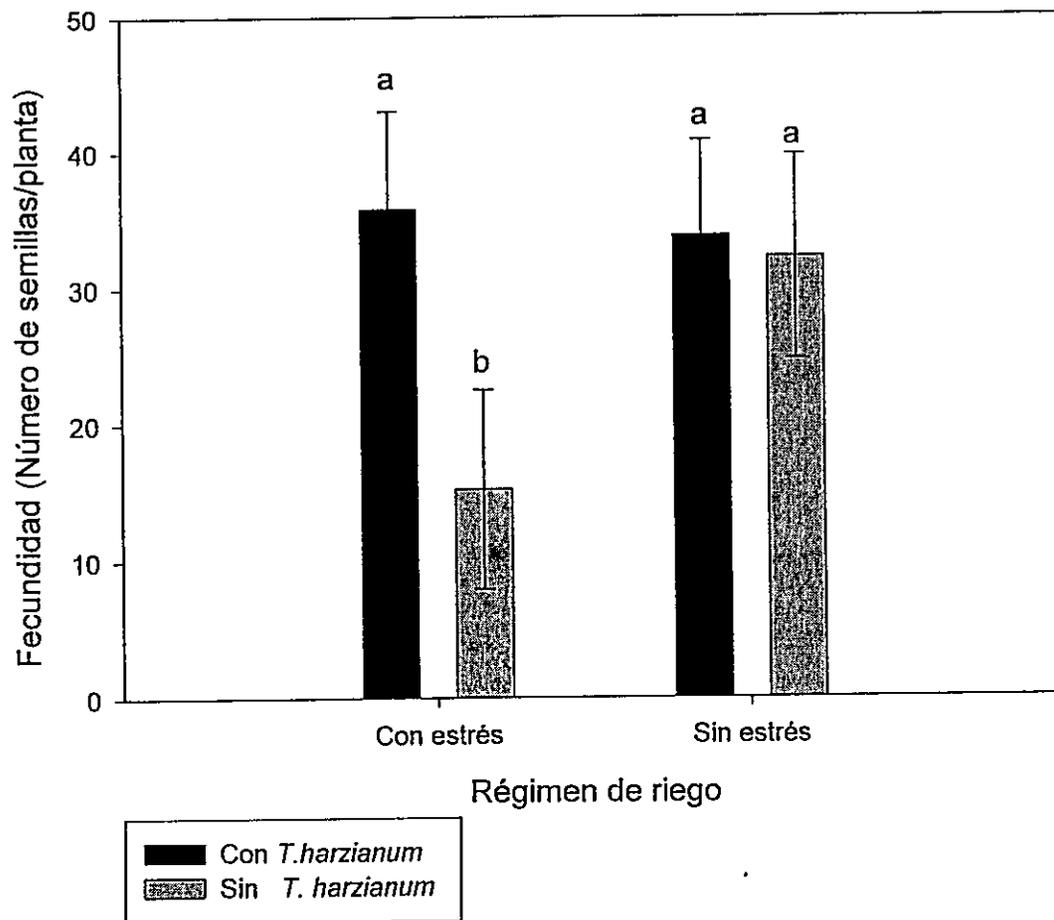


Figura 3. Fecundidad, expresada como número de semillas/planta de *Triticum aestivum* var. Alifén, en respuesta a tratamientos con presencia/ausencia de estrés hídrico y la presencia/ausencia de *Trichoderma harzianum* cepa Queule.

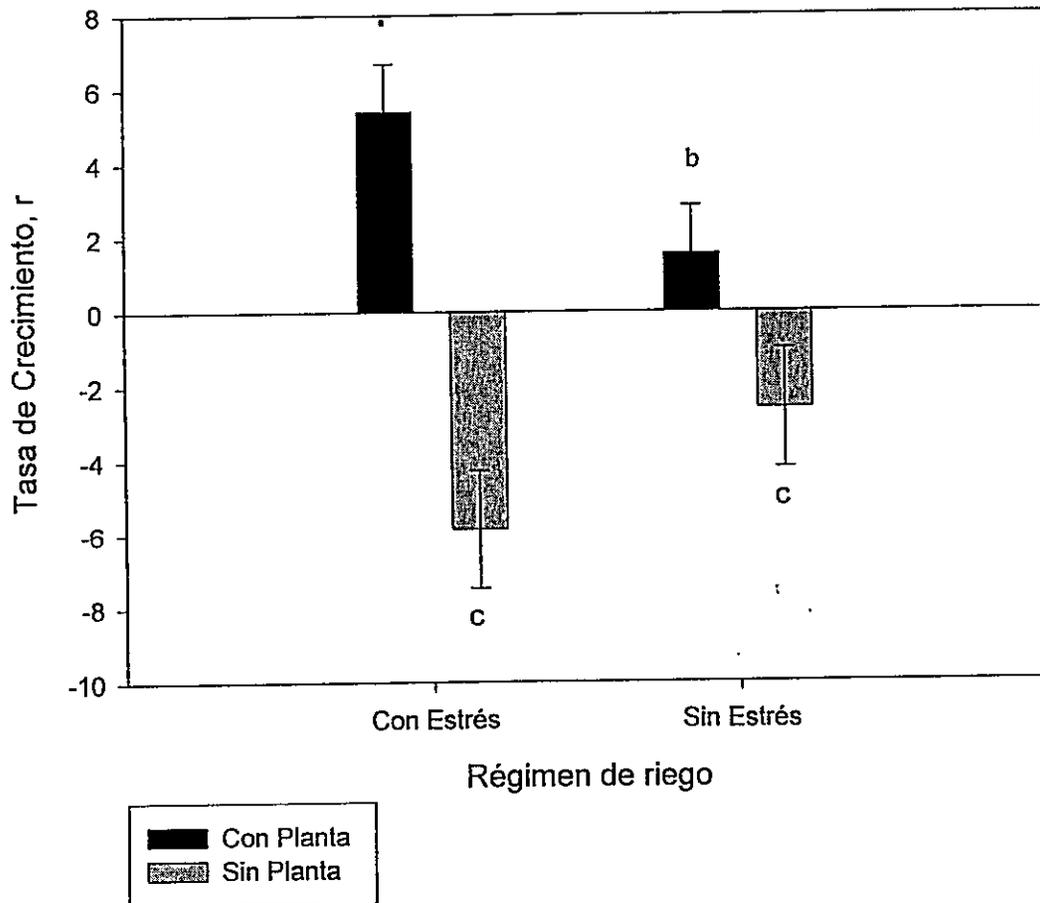


Figura 4. Tasa de crecimiento (r) de *Trichoderma harzianum* cepa Queule, en respuesta a tratamientos con presencia /ausencia de plantas de *Triticum aestivum* var. Alifén y ausencia/presencia de estrés hídrico.

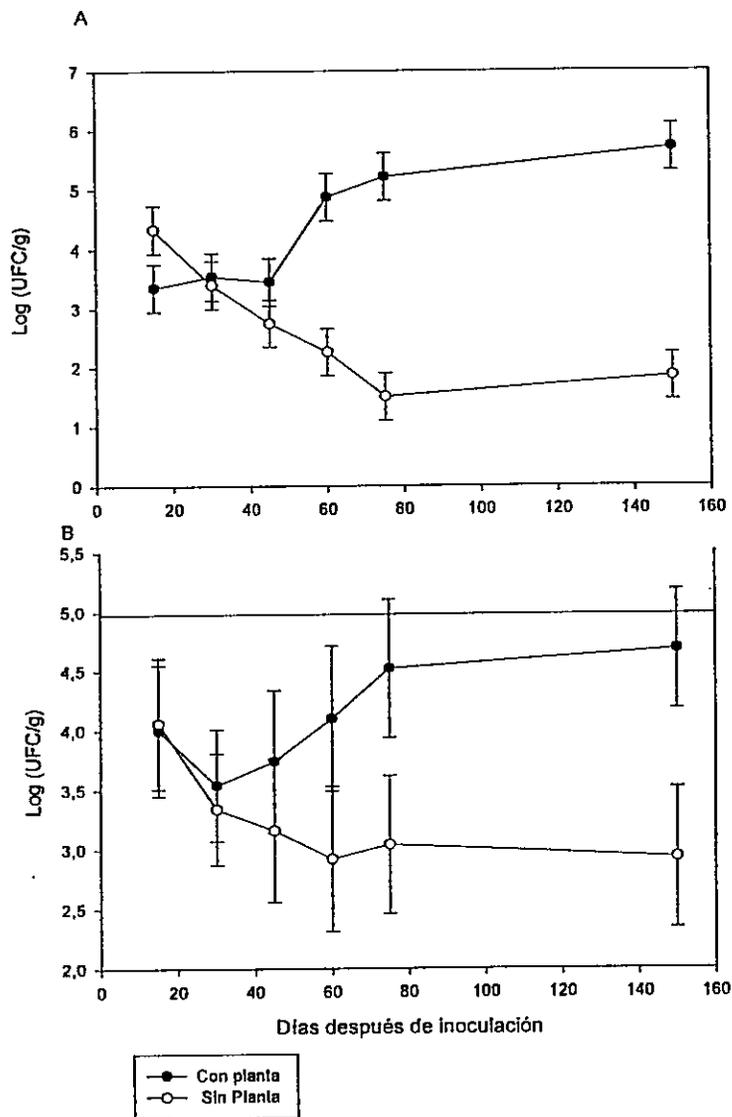


Figura 5. Población de *Trichoderma harzianum* cepa Queule expresado como logaritmo de unidades formadoras de colonias/g de suelo, en presencia/ausencia de *Triticum aestivum* var. Alifén, bajo dos condiciones de disponibilidad de agua, presencia (A) y ausencia (B) de estrés hídrico.

DISCUSIÓN.

Los resultados indican la capacidad del hongo de estimular el vigor de las plantas (Figuras 1 y 2) y además incrementar su adecuación biológica (Fig. 3). Por su parte, el hongo se ve beneficiado por la presencia de las plantas, tanto en sus poblaciones finales (Fig. 5), como en su tasa de crecimiento poblacional (Fig. 4). Estas observaciones sustentan las primeras dos hipótesis planteadas, y establecen la existencia de una relación mutualista entre plantas de trigo y *Trichoderma*.

La interacción mutualista mostró una dependencia del contexto ambiental donde se desarrolló, expresándose con beneficios para la planta bajo condiciones de estrés hídrico (Figuras 1,2 y 3), mientras que para *Trichoderma* el estrés hídrico en presencia de plantas aumentó significativamente la tasa de crecimiento, mientras que en ausencia de plantas no hubo efecto del estrés (Fig. 4). Estos resultados validan la tercera hipótesis que planteaba que el mutualismo debería expresarse con mayor intensidad frente al estrés. Es necesario destacar que en ausencia de estrés no se expresó mutualismo desde el punto de vista de la planta, mientras que bajo esta condición se incrementó el beneficio para el hongo, lo cual es evidencia de la importancia de los mutualismos bajo condiciones ambientales limitantes.

Un resultado destacable de esta investigación es haber obtenido evidencia cuantitativa del beneficio obtenido por *T. harzianum* de su interacción con una

planta, en este caso *T. aestivum*. Una de las razones de esta escasez de estudios se debe, entre otras razones, a las dificultades para lograr evaluaciones de desempeño. En este estudio se pudo evaluar la tasa intrínseca de crecimiento de los hongos como una de adecuación biológica a nivel poblacional.

La mayor parte de los estudios que sugieren efectos facilitadores de plantas sobre hongos son correlacionales. Por ejemplo, en suelos de bosques nativos del Japón las poblaciones de *Trichoderma* presentan máximos de densidad poblacional durante el máximo crecimiento de las raíces de los árboles, supuestamente porque las raíces les proveerían mejores condiciones y recursos para su desarrollo (Jha *et al.* 1992). De hecho, el microambiente existente a nivel de las raíces es favorable para los hongos debido a que existe mayor concentración de oxígeno, un pH entre 5 y 7 y una mayor disponibilidad de carbono orgánico (Eastburn & Butler 1988, Cook & Baker 1989).

En otros taxones existen otros ejemplos de interacciones mutualistas condicionadas por el ambiente. El trabajo de McCreadie *et al.* (2005) muestra la naturaleza contexto-dependiente de la asociación entre hongos del género *Trichomyces*, que coloniza el sistema digestivo de larvas de simuliido (Diptera). Se observó que la interacción era mutualista, pero sólo bajo condiciones de estrés alimenticio para el hospedero.

En el caso de interacciones planta-microorganismos se puede citar el caso del mutualismo entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*, donde la formación de nódulos bacterianos se produce en las raíces de la planta sólo si existe deficiencia de nitrógeno en el suelo (Begon *et al.* 1999). Otros autores han reportado la importancia de las condiciones del suelo sobre la capacidad de la bacteria de infectar los pelos radicales de la planta (Atlas & Bartha 2002). El clima donde se desarrollan estas interacciones también juega un papel importante. Así, la simbiosis planta-rizobio o planta-cianobacteria se da con mayor frecuencia en climas tropicales y las asociaciones actinomicete-planta se dan en climas templados (Benson & Silvester, 1993).

En interacciones hongo-planta se ha estudiado el caso de la relación entre gramíneas del género *Festuca* (*Festuca arudinacea*) y hongos endófitos, los cuales bajo condiciones de baja disponibilidad de recursos (*i.e.* sequía) o herbivoría generan un mutualismo de protección sobre la planta, frente al ataque por áfidos y larvas de lepidóptero (Bultman & Bell, 2003).

Algunas especies de orquídeas generan relaciones simbióticas con los hongos *Armillaria mellea* y *Rhizoctonia solani*, generando una mayor capacidad de germinación de las semillas de orquídea. Los hongos en condiciones de estrés nutricional o hídrico pueden llegar a ser patógenos de la planta, en tanto la planta es capaz de digerir parte del micelio del hongo (Atlas & Bartha, 2002). En relaciones micorriza-planta, también se han observado variaciones en la

generación del mutualismo debidas a factores bióticos y abióticos (Setälä *et al.* 1997). En el caso específico de la interacción *Trichoderma*-planta, existen varios reportes sobre la capacidad de *Trichoderma* de estimular el crecimiento de plantas bajo condiciones de estrés, tales como déficit hídrico y de nitrógeno en el caso del maíz (Harman 2000, Harman & Björkman, 1998) y déficit de radiación fotosintética en lechuga y repollo (Rabeendran *et al.* 2000). También se ha detectado que los factores ambientales, tales como contenido de agua del suelo y pH, afectan la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* (Clarkson *et al.* 2004, Kedrics *et al.* 2004).

Estos efectos mutualistas condicionados por el contexto ambiental forman parte de un modelo más general, en el cual otras interacciones biológicas parecieran ser contexto-dependiente. Por ejemplo, en el caso de relaciones de parasitismo, se ha desarrollado el modelo de Triángulo de enfermedades, utilizado en fitopatología, donde los requisitos para el desarrollo de una enfermedad son: 1) Patógeno en estado virulento; 2) Hospedero en estado susceptible y 3) Condiciones ambientales pre-disponentes. Así, sólo cuando estas tres condiciones coinciden en tiempo y espacio, se desarrolla la interacción entre patógeno y hospedero, en este caso el estado de enfermedad (Agrios, 2005).

Los ejemplos al respecto son numerosos. En el caso de la sarna del manzano, causada por el hongo *Venturia inaequalis* (Ascomycete). El hongo inicia su ciclo

con la liberación de ascosporas, después de acumular cierto número de horas-frío y posteriormente grados-días. Una vez maduros y en condiciones ambientales de agua libre y cierta temperatura, estos pseudotecios liberan las ascosporas, las que germinan e inician la infección primaria, generando conidias que se liberan e infectan la epidermis tanto de hojas como de frutos, también bajo condiciones de agua libre, pudiendo completar varios ciclos durante la temporada de crecimiento dependiendo de la ocurrencia de lluvias o nieblas intensas. De esta forma se puede dar el caso de que si no se producen lluvias o no existen condiciones de agua libre, pese a la presencia del hongo sobre tejidos susceptibles de la planta, la enfermedad no es capaz de expresarse (Agrios, 2005).

Este modelo propuesto, al aplicarlo a nuestro caso de estudio, nos lleva al concepto de mutualismo condicional definido por Herre *et al.* (1999) como el mutualismo que, a causa de fuerzas ecológicas (abióticas y bióticas), varía en el tiempo y espacio. Así, Bronstein (1994) expone que la variación en los beneficios obtenidos por los miembros del mutualismo se cumple cuando: 1) el mutualismo es condicional antes que obligado; 2) una tercera especie está íntimamente involucrada en la interacción y 3) el beneficio de la interacción es función de la abundancia relativa de los mutualistas. Sin embargo, estos modelos se han desarrollado principalmente en interacciones multitróficas insecto-planta (Bronstein 1994, Del-Claro 2004, Reithel 2002). Nuestros resultados mostraron que el mutualismo entre *Triticum* y *Trichoderma* no es

obligado y está condicionado por el efecto del estrés hídrico, pero no existen antecedentes de la influencia de una tercera especie. Asimismo, debido a la utilización de las mismas abundancias iniciales en todos los tratamientos no se pudo a prueba la tercera condición.

Los resultados de esta tesis indican además que frente a cambios ambientales bruscos, las especies dispondrían de posibilidades de sobrellevar el estrés al fortalecer interacciones mutualistas no existentes bajo otras condiciones ambientales. El calentamiento global, por ejemplo, podría inducir incrementos en el número de mutualismos condicionales, y por lo tanto permitir a las plantas sobrevivir frente a estas nuevas condiciones ambientales.

CONCLUSIONES

- 1.- Existe una interacción mutualista entre *Trichoderma* y *Triticum*, que se manifiesta en incrementos en la adecuación biológica de ambos.
- 2.- La interacción mutualista no depende sólo de la presencia de ambos organismos, sino que esta interacción se desencadena por la presencia de una situación de estrés, en este caso falta de agua, por lo que sería un mutualismo facultativo.
- 3.- En consideración a la segunda conclusión, el modelo conceptual de mutualismos debería incluir un elemento ambiental, que modularía la generación e intensidad de la interacción.
- 4) Los mutualismos condicionados por contexto ambiental podrían incrementarse en un futuro escenario de incremento del estrés ambiental a causa del calentamiento global, que disminuiría la disponibilidad de agua.

REFERENCIAS

AGRIOS G (2005) Plant Pathology Editorial Elsevier Academic Press, London. 79-81

ALTOMARE C, W NORVELL, T BJÖRKMAN & G HARMAN (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai strain 1295-22. Applied and Environmental Microbiology 65: 2926-2933.

ATLAS R & R BARTHA (ed) (2002) Ecología Microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación. Madrid 677pp.

BAKER R (1988) Improved *Trichoderma* spp. for promoting crops productivity. Trends in Biotechnology 7:34-38.

BENSON D & W SYLVESTER (1993) Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiological Review 57:293-319.

BEGON M, J HARPER & C TOWNSEND (1999) Ecology: Individuals, Populations, and Communities Third Edition Blackwell Science Inc USA 1088 pp.

BEHL R, H SHARMA, V KUMAR & N NARULA (2003) Interactions amongst Mycorrhiza, *Azotobacter chroococcum* and Root Characteristics of Wheat Varieties. Journal of Agronomy and Crop Science. 189: 15 – 19

BERTNESS M & R CALLAWAY (1994) Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 191–193.

BLANCHARD L & T BJÖRKMAN (1996) The role of auxin in enhanced root growth of *Trichoderma*-colonized sweet corn.
<http://www.nysaes.cornell.edu/hort/faculty/Bjorkman/other/abstracts/ASPP96.html>

BJÖRKMAN T, B L BLANCHARD & G HARMAN (1998) Growth enhancement of shrunken-2(sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of environmental stress. Journal of the American Society for Horticultural Science 123: 35-40.

BOUCHER D (1985) *The Biology of Mutualism*. Oxford University Press, New York. 386 pp

BRETON L & J ADDICOT (1992) Density-dependent mutualism in an aphid-ant interaction. *Ecology* 73: 2175-2180.

BRONSTEIN J (1994) Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 214-217.

BULTMAN T & G BELL (2003) Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. *Oikos* 103: 182-190.

CALLAWAY R, R BROOKER, P CHOLER, Z KIKVIDZE, C LORTIE, R MICHALET, L PAOLINI, F PUGNAIRE, B NEWINGHAM, E ASCHEHOUG, C ARMAS, D KIKODZE & B COOK (2002) Positive interactions among alpine plants increase with stress. *Nature* 417: 844-848.

CHANG Y-C, R BAKER, O KLEIFELD & I CHET (1986) Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145-148.

CLARKSON J, A MEAD, T PAYNE & J WHIPPS (2004) Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology* 53: 353-362.

COOK J & K BAKER (1989) *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. 2nd Ed. The American Phytopathological Society USA. 539 pp.

CUSHMAN J & T WHITHAM (1989) Conditional mutualism in a membracid-ant association: temporal, age specific, and density dependent effects. *Ecology* 70: 1040-1047

DEL-CLARO K (2004) Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in broptical savannas neotropical *Entomology* 33:665-672.

DUFFY B , A SIMON & D WELLER (1996) Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent *Pseudomonas* for control of take-all on wheat. *Phytopatology* 86: 188-194.

EASTBURN D & E BUTLER (1988) Microhabitat characterization of *Trichoderma* in natural soil: evaluation of factors affecting population density. *Soil Biology Biochemistry* 20: 541-546

HANSON P & J WELTZIN (2000). Drought disturbance from climate change: response of United States forests. *Science of Total Environment* 262: 205-220.

HARMAN G (2003) *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system).
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/Trichoderma.html>

HARMAN G & T BJÖRKMAN (1998) Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: HARMAN G & KUBICEK C (eds.) *Trichoderma and Gliocladium*. Vol .2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis, London, England: 229-266.

HARMAN G (2000) Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Diseases* 84:377-393.

HERRE E, N KNOWLTO , M MUELLER & S REHNER (1999). The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecology and Evolution* 14: 49-53.

GUPTA N (2001) Evaluation of synergistic effect of phosphate solubilizing *Penicillium* spp, A.M. fungi and rock phosphate on growth and yield of wheat
http://www.stii.dost.gov.ph/pisweb/data/Synergistic_effect.htm

INBAR J, M ABRAMSKY, D COHEN & I CHET (1994) Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions *European Journal of Plant Pathology* 100: 337-346.

JHA D, G SHARMA & R MISHRA (1992) Ecology of soil microflora and mycorrhizal symbionts in degraded forests at two altitudes. *Biology and Fertility of Soils* 12: 272-278.

JOFFRE R (1988) Soil water improvement by trees in the rangelands of southern Spain. *Acta Oecologica* 9: 405-422.

KREDICS L, L MANCZINGER, Z ANTAL, Z PE'NZES, A SZEKERES, F KEVEI & E NAGY (2004) *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth

and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potencial. *Journal of Applied Microbiology* 96: 491–498.

KLEIFELD D & I CHET (1992) *Trichoderma harzianum* – interactions with plants and effect on growth response. *Plant and Soil* 144: 267-272.

LYNCH J, K WILSON, M OUSLEY & J WHIPPS (1991) Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Letters in Applied Microbiology* 12:56-61.

MACKENZIE A, T STARMAN & M WINDHAM (1995) Enhanced root and shoot growth of *Chrysanthemum* cuttings propagated with the fungus *Trichoderma harzianum*. *HortScience* 30:496-498.

MAESTRE F, F VALLADARES & J REYNOLDS (2005) Is the change of plant-plant interactions with abiotic stress predictable? A meta-analysis of field results in arid environments. *Journal of Ecology* 93: 748-757.

McCREADIE J, C BEARD & P ADLER (2005) Context-dependent symbiosis between black flies (Diptera: Simuliidae) and Trichomycete fungi (Harpellales: Legeriomycetaceae). *Oikos* 108: 362-370.

MELLADO M & R MADARIAGA (1992) Manual de producción de trigo en las zonas de riego de la VII y VIII Regiones. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Estación Quilamapu, Chillán. 106 pp.

MOUSAIN D (1997) Le Rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée des arbres forestiers. *Rev. Forestier* 49 : 67-81.

MULLER R, M CRESCENT, M SCUDDER, R. TALBOT , C GEHRING & T WHITHAM (2005) Differential tree mortality in response to severe drought: evidence for long-term vegetation shifts. *Journal of Ecology* 93: 1085-1093.

NASEBY D, J PASCUAL & J LYNCH (2000) Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzymes activities. *Journal of Applied Microbiology* 88: 161-169.

OPAZO M (1999). Evaluación de la resistencia a estrés hídrico y estabilidad de rendimiento en 144 genotipos de trigo. Tesis de Ing. Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, Santiago Chile, 143 pp.

OUSLEY M, J LYNCH & J WHIPPS (1993) Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. *Microbial Ecology* 26: 277-285.

PERELLO A, C MONACO, & G C CORDO (1997) Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocadium roseum*, in controlling leaf blotch of wheat (*Septoria tritici*) under *in vitro* and greenhouse conditions. .Z. Pflanzarkr. Pflanzanschutz 104: 588-598.

PERELLO A, C MONACO, M SIMON, M SISTERNA & G DAL BELLO (2003) Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. Crop Protection 22: 1099-1106.

PLASSARD C (1991) Assimilation of mineral nitrogen and ion balance in the two partners of ectomycorrhizal symbiosis: data and hypothesis. Experientia 47 : 236-242.

POSS J & W JARREL, (1985) Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate. Plant and Soil 88: 307-319.

PRICE P (1986) Parasite mediation of ecological interactions. Annual Review of Ecology and Systematics 17: 487-505.

RABEENDRAN N, D MOOT, E JONES & A STEAWRT (2000) Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. En 53rd Conference Proceedings of The New Zealand Plant Protection Society Incorporated. <http://www.hortnet.co.nz>

REITHEL J (2002) Host plant mediation of a conditional mutualism. ESA 2002 Annual Meeting. <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/esa2002/document/?ID=4539>

RUIZ-LOZANO J, R AZCON & M GÓMEZ (1996) Alleviation for salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. Physiologia Plantarum 98: 767-772.

SCHALL J (1992) Parasite-mediated competition in Anolis lizards. Oecologia 92: 58-64.

SETALA H, J RISSANEN & A MARKKOLA (1997) Conditional outcomes in the relationship between pine and ectomycorrhizal fungi in relation to biotic and abiotic environment. Oikos 80: 112-122.

SMITH V, W WILCOX & G HARMAN (1990). Potential for biological control of Phtophthora root and crown rots of apples by *Trichoderma* and *Gliocadium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.

SOKAL R & F ROHLF (1995) *Biometry* . 3rd ed. W.H. Freeman and Company, New York, USA, 887 pp.

VANDERMEER J & D BOUCHER (1978) The varieties of mutualistic interactions in population models. *Journal of Theoretical Biology* 74: 549-558.

WINDHAM MT, ELAD Y & R BAKER. (1986) A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-521.

ANEXO I

Fórmulas y cálculos utilizados en la definición de los regímenes de riego.

Sobre la base de las características del sustrato utilizado, que se detallan abajo, se calculó la humedad aprovechable (HA), equivalente en mediante la formula

$$HA = (CC - PMP) \times Da$$

Profundidad 15 cm

Densidad aparente (Da) 0,9

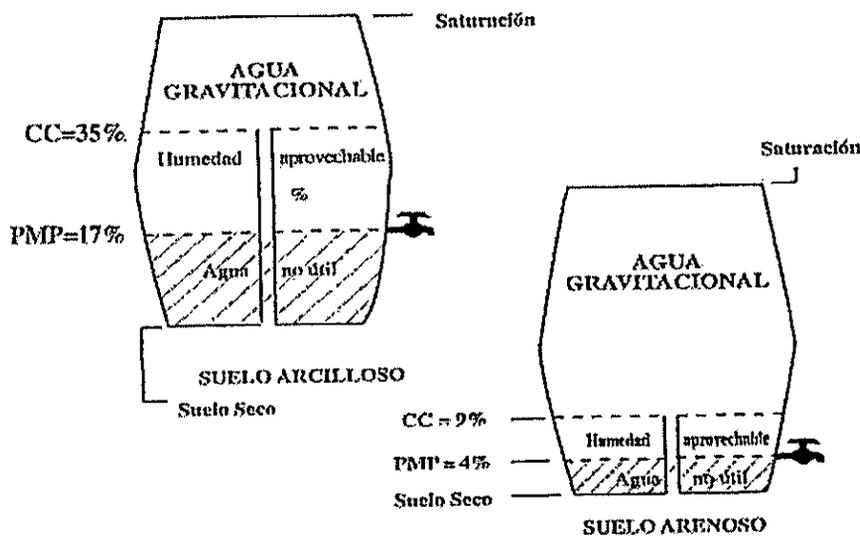
Capacidad de campo (CC) 86,7 %

Punto de marchites permanente (PMP) 75 %

Humedad aprovechable (HA) 10,53 %

Capacidad de estanque (Ce) 15,79 mm.

Los análisis fueron realizados por el Laboratorio de Suelos de la Universidad de Concepción.



Una vez determinada HA, se determinó la cantidad (mm) de agua consumida, correspondientes a cada régimen de riego.

Régimen sin estrés: 40% de HA, correspondiente a evapotranspiración

$$EVT = HA \times Ce \times 0,6 = 0,99 \text{ mm.}$$

Régimen con estrés: 20% de HA, correspondiente a evapotranspiración

$$EVT = HA \times Ce \times 0,8 = 1,33 \text{ mm}$$

Una vez determinada EVT, para cada régimen de estrés se determinó la evaporación de bandeja (E_b), utilizando la formula 2

$$EVT = Kc \times Kb \times E_b \quad (2)$$

Donde:

EVT: Evapotranspiración

Kc: Coeficiente de cultivo

Kp: Coeficiente de bandeja

En la tabla 2 se detallan las Eb en mm, para cada régimen de riego en cada fase del cultivo.

Tabla 2 Evaporación de Bandeja (Eb), en mm, para las distintas fases del cultivo de trigo, bajo condiciones con y sin estrés hídrico.

Régimen	Fases del cultivo				
	Inicial	Desarrollo	Mediados	Finales	Cosecha
Sin estrés	7,92	3,39	2,26	3,65	11,88
Con estrés	5,94	2,54	1,70	2,74	8,91

Tabla 3. Coeficiente de cultivo referencial (kc)

	Desarrollo	Mediados	Finales	Cosecha	
	Inicial	del cultivo	del período		del período
Trigo	0,3-0,4	0,7-0,8	1,05-1,2	0,65-0,7	0,2-0,25

Nota: Valores extraídos de requerimiento de los cultivos, Dorembos y Pruitt, 1976(Citado por Mellado y Madariaga, 1992).