

LA INOCULACIÓN CON *Glomus fasciculatum* EN EL CRECIMIENTO DE CUATRO ESPECIES FORESTALES EN VIVERO Y CAMPO

William Hernández^{1*}, Eduardo Salas^{**}

Palabras clave: *Tectona grandis*, *Gmelina arborea*, *Astronium graveolens*, *Terminalia Amazonia*, micorriza.
Keywords: *Tectona grandis*, *Gmelina arborea*, *Astronium graveolens*, *Terminalia Amazonia*, mycorrhizae.

Recibido: 04/12/08

Aceptado: 26/02/09

RESUMEN

La presente investigación se realizó para conocer la respuesta de 4 especies forestales a la aplicación del *Glomus fasciculatum* en vivero y campo. En la fase de vivero se evaluó diámetro basal, altura total, peso seco del follaje y radicular, absorción de nutrimentos en el follaje y el sistema radicular. En campo se cuantificó altura total, diámetro, y absorción de nutrimentos en el follaje. Los resultados mostraron que en vivero los mayores incrementos promedio, en los tratamientos inoculados, los registró el ronrón (*Astronium graveolens*), la teca (*Tectona grandis*) y el amarillón (*Terminalia amazonia*), con 48,9, 35,2 y 30,6%, respectivamente; mientras que en melina (*Gmelina arborea*) el incremento fue de 16,9%. El mayor incremento se registró en el peso seco del follaje y en el radicular con 30,8 y 63%, respectivamente. En la absorción de nutrimentos el ronrón mostró diferencias en Mg, Cu, Zn, Mn y Fe, tanto en el follaje como en el sistema radicular; sin embargo, melina fue la especie que registró las concentraciones de nutrimentos superiores, aunque no significativas; las demás especies no registraron diferencias significativas. En el campo, en las plantas inoculadas, solamente melina reflejó diferencias significativas en diámetro y altura total, con un incremento de 37,9 y 31,7%, respectivamente. La absorción de nutrimentos de melina, amarillón y ronrón fue en promedio 32,2, 19,8 y 6,6%, respectivamente,

ABSTRACT

Effect of inoculation with *Glomus fasciculatum* on nursery and field growth of four forest tree species. The aim of this research was to evaluate the response of 4 forest tree species to *Glomus fasciculatum*, inoculated at nursery and field stages. At nursery stage the diameter above ground, total height, dry leaf and root weight, and nutrient intake by leaves and roots were evaluated. In the field total height, diameter, and leaves' nutrient intake were quantified. Results showed that at the nursery stage inoculated ronrón (*Astronium graveolens*), teca (*Tectona grandis*), and amarillón (*Terminalia amazonia*), presented the average highest increases with 48.9, 35.2 and 30.6%, respectively; whereas in melina (*Gmelina arborea*) the increase was only 16.9%, registering significant differences in leaf and root dry weight. Overall, dry weight increases of leaves and roots showed the highest values, with 30.8 and 63%, respectively. Regarding nutrient absorption, ronrón showed significant differences in Mg, Cu, Zn, Mn, and Fe in leaves and roots; however, melina was the species with the highest nutrient concentrations, even though not statistically significant; the rest of the species did not register significant differences. At field stage, among the inoculated species, melina was the only one showing significant differences in diameter and total height, with 37.9 and 31.7% increases, respectively. Average nutrient

1 Autor para correspondencia. Correo Electrónico: whernan@una.ac.cr

* Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

** Escuela de Ciencias Agrarias (ECA), Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

con una mayor absorción en Ca, Mn, K y Fe. La mortalidad en vivero fue nula, mientras que en el campo, varió de acuerdo con la especie y el tratamiento. El aumento en el crecimiento de las 4 especies fue la tendencia común, a excepción de teca, que en el campo no mostró resultados positivos.

absorption by melina, amarillón, and ronrón was 32.2, 19.8 and 6.6%, respectively; with the highest absorption in Ca, Mn, K and Fe. Mortality at the nursery stage was zero; whereas in the field, it varied according to the species and treatment. The increase in growth of the 4 species was the common tendency, when *G. fasciculatum* was used, except in teca, which did not show positive results in the field.

INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas utilizadas a lo largo de las últimas décadas han conducido a reconsiderar muchos de los sistemas de producción actuales, debido al uso desmedido de insumos químicos, incluyendo fertilizantes y pesticidas; dando lugar a una gran contaminación, a la disminución de la biodiversidad microbiológica del suelo y a la degradación de ecosistemas frágiles. Por tal razón, más recientemente se ha venido dando una nueva corriente de producción agrícola, enfocada a la agricultura sostenible y orgánica, tratando de sustituir las prácticas de producción convencional. Para esto se requiere de una visión más amplia de las interacciones biológicas dentro de los agroecosistemas; en este sentido, los hongos micorrícicos parecen ser un componente fundamental dentro de las nuevas alternativas de producción. Además de las funciones conocidas en la nutrición de las plantas, las micorrizas pueden influir en el proceso estructural y de agregación del suelo (Rillig y Mummey 2006), siendo estas razones de peso para considerar el efecto que pueden tener estos hongos tanto a nivel fisiológico de la planta, como a nivel del suelo y por ende en la restauración de ecosistemas (Asbjornsen y Montagnini 1994).

Las micorrizas se definen como una asociación simbiótica, mutualista, entre las raíces de

las plantas superiores y hongos del suelo (Blanco y Salas 1997, Schubler et al. 2001). El concepto fue definido por Frank en el año 1885 (Pérez y Read 2004). Las micorrizas se clasifican de acuerdo con su estructura, morfología y modo de infección en 2 tipos principales: ectomicorrizas y endomicorrizas (Fortín y Carlisle 1984).

Entre los beneficios que ofrecen las micorrizas arbusculares en el crecimiento de las plantas, se encuentra un aumento en la absorción de P, (Bolan 1991, Salamanca y del Río 1998). Las plantas asociadas con hongos micorrícicos exploran de 10 a 200 veces más volumen de suelo y absorben y transportan hacia la raíz más intensivamente aquellos elementos nutritivos que son poco disponibles para la planta (Sierverding 1989).

Inoculación con micorrizas

En Costa Rica, la inoculación con micorrizas no ha sido muy significativa, quizás por la carencia de investigación a nivel nacional que demuestre la importancia y aplicabilidad de las micorrizas en plantaciones forestales. Las primeras investigaciones en el país se realizaron con 6 especies de pino, con una ectomicorriza tomada de rodales naturales de *Pinus oocarpa* y *P. pseudostrobus* de Honduras, utilizando el suelo como inóculo. Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables peso verde y seco,

altura total, número y longitud de agujas (Vega 1964). Posteriormente, se realizó un ensayo con plántulas de *Quercus costarricensis*, utilizando diversos procesos de inoculación ectomicorrícica. Dicho ensayo mostró que a los 7 meses las plántulas inoculadas con los hongos *Lactarius sp.* y *Andropogon sp.* registraron el mejor crecimiento en altura, diámetro al cuello de la raíz y biomasa foliar (Rojas y Chaverri 1992).

Los resultados de una investigación, a nivel de vivero, incorporando endomicorrizas y rizobacterias al suelo, con las especies forestales laurel (*Cordia alliodora*) y roble sabana (*Tabebuia rosea*), indicaron que cuando se aplicó micorriza vesículo arbuscular hubo diferencias significativas, en área foliar, altura, número de hojas y peso seco, mostrando un mejor crecimiento en ambas especies. Se encontró también que existe cierto grado de especificidad entre el hongo micorrícico y la especie forestal. Los hongos más comunes encontrados en los suelos donde crecen en forma natural el laurel y el roble sabana pertenecen a los géneros *Glomus* y *Gigaspora* (Cuervo 1997).

Una investigación realizada en Costa Rica con las especies leucaena (*Leucaena leucocephala*), guayaquil (*Albizia guachapelle*) y teca (*Tectona grandis*), mostró que el vigor y el crecimiento de dichas especies fue mayor que el del testigo, cuando se les aplicó micorriza vesículo arbuscular. Reflejó también que el tipo de suelo utilizado influyó en la efectividad de los hongos micorrícicos, debido principalmente a las características químicas, físicas y microbiológicas del suelo (Rojas 1992).

Glomus fasciculatum

Investigaciones con esta especie de hongo micorrícico han mostrado una mejora en el crecimiento de las plantas en etapa juvenil. Un estudio realizado en la India con *Cassia siamea* mostró una concentración mayor de P, K, Cu, Zn y N en las plantas inoculadas con *G. fasciculatum* que en las no inoculadas (Bhoopander et al. 2005).

Esta especie de hongo ha mostrado tener una gran versatilidad en condiciones de suelo, clima y en diferentes cultivos. En plantaciones de *Peterocarpus santalinus*, una especie

utilizada en la India con fines medicinales, en condiciones de estrés hídrico y sobreriego, mostró que las plantas inoculadas tuvieron una mayor estimulación en el crecimiento vegetal y en la obtención de P y N, en ambos regímenes de riego (Vijaya y Srivasuki 2001).

Otra aplicación de *G. fasciculatum* ha sido en la micropropagación de plántulas de *Sesbania sesban* (un árbol de uso múltiple), las cuales una vez producidas en laboratorio fueron trasplantadas a suelo estéril e inoculadas con *G. fasciculatum*; manteniendo un testigo. El estudio mostró que solamente sobrevivió un 30% de las plántulas que no tenían la micorriza, mientras que 100% de las inoculadas sobrevivió. Estas observaciones demostraron que la asociación micorrícica ayuda a las plantas micropropagadas en su fase de aclimatización (Subhan et al. 1998). Se ha comprobado que plantas de caupí (*Vigna unguilata*) inoculadas con *G. fasciculatum* han mostrado resistencia al marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum*; produciendo un mayor contenido de fitoalexinas en las plantas inoculadas (Sundaresan et al. 1993).

El objetivo de la presente investigación fue conocer la respuesta de 4 especies forestales a la inoculación con *Glomus fasciculatum* en vivero y en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y material vegetal

La investigación involucró una fase de invernadero y otra de campo, ambas se realizaron en la zona sur de Costa Rica, específicamente en Pérez Zeledón, a 702 msnm.

Las especies forestales utilizadas fueron: teca (*Tectona grandis*) y ronrón (*Astronium graveolens*), cuyas semillas provenían del Banco de Semillas del Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), localizado en Turrialba, Costa Rica. Otra especie fue amarillón (*Terminalia amazonia*), la semilla fue recolectada de árboles identificados y seleccionados como semilleros en la zona. La semilla de las

especies en cuestión se puso a germinar en bancales para su posterior repique (trasplante) a las bolsas. La cuarta especie fue melina (*Gmelina arborea*), donde se utilizó plántulas provenientes de material clonal, del programa de mejoramiento genético de CoopeAgri R.L.

Tratamientos y diseño experimental

Para ambas fases (vivero y campo) se elaboró un diseño estadístico completamente al azar, 2 tratamientos (con inóculo y sin inóculo) y 4 repeticiones. Las parcelas experimentales en vivero estuvieron compuestas por 20 árboles de cada especie, sembrados en bolsas de 15x25 cm. En el campo se establecieron parcelas experimentales de 10 individuos por especie y por tratamiento, distribuidas al azar, manteniendo una hilera extra para contrarrestar el efecto de borde. De modo que el ensayo en vivero consistió en:

T₁=Inoculación con la micorriza (5 g.planta⁻¹), aplicado al sustrato de la bolsa al trasplante.

T₂=Testigo, sin inoculación con la micorriza.

Las plantas utilizadas en el ensayo de campo fueron las mismas que formaron parte del ensayo en vivero. Durante el período de evaluación las plantas recibieron el mismo manejo, tanto en vivero como en el campo, pero suprimiendo toda aplicación de fertilizantes granulados y foliares. El suelo utilizado para ambos tratamientos en vivero no fue esterilizado, ni se le aplicó tratamiento adicional, con el propósito de que el ensayo generara resultados aplicables al sistema tradicional de producción de los viveros de la zona.

La evaluación de las diferentes variables se realizó a los 60 días para las especies teca y melina, mientras que para el amarillón y ronrón se hizo a los 90 días de trasplantados en bolsas. Se cuantificó el porcentaje de mortalidad, altura total y diámetro basal. En campo se evaluó el diámetro a los 14 y 17 meses de plantados los árboles. Se marcó en la primera evaluación con pintura permanente el lugar de medición del

diámetro en el fuste del árbol. En el caso de la altura total se midió con una vara telescópica, a los 6, 14 y 17 meses de plantados los árboles. La mortalidad se cuantificó a los 17 meses.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el ensayo en vivero fueron analizados con el programa SAS, mientras que para la información de campo se utilizó el programa InfoStat. En ambos casos se realizó análisis de varianza y prueba de comparación de medias para las distintas variables evaluadas.

Análisis de la colonización de micorrizas

Tinción: Este proceso se realizó solamente para el ensayo en vivero, siguiendo la metodología de tinción de raíces de Phillips y Hayman (1970), con algunas modificaciones. Para teñir las estructuras de los hongos se procedió a lavar las raíces con agua corriente, para remover el suelo adherido a las mismas, se colocaron en tubos de ensayo, adicionando hidróxido de Potasio (KOH) al 10% hasta cubrir las, se les dejó en baño María a 90°C por 40 min, después el KOH fue decantado y se lavó las raíces con agua corriente. A las raíces de ronrón y amarillón se les agregó peróxido de hidrógeno con el fin de aclararlas, se les dejó a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se decantó el peróxido de hidrógeno. Luego, en tubos de ensayo, se depositaron las 4 muestras de las especies por separado, agregando el tinte, el cual había sido preparado previamente en una solución de agua, glicerol y ácido láctico (1:1:1). Se agregó azul de trypan a 0,05 g.100 ml⁻¹ de agua, dejando en baño María por 40 min a 90°C. Este análisis se hizo tanto para las plantas que habían sido inoculadas como para las plantas testigo, para observar diferencias a nivel radicular y utilizar esta información como un medio para corroborar la colonización por el hongo micorrízico.

Análisis de suelo y foliares

Los análisis de suelo y foliares se realizaron en el Laboratorio de Suelos del INISEFOR.

Para evaluar el suelo del vivero se seleccionó una muestra de 1 kg del sustrato utilizado, donde se obtuvo una muestra representativa utilizando la metodología establecida para este tipo de análisis. En el campo, el suelo se obtuvo haciendo un muestreo en varios puntos del sitio de la plantación, utilizando un barreno se colectó diferentes submuestras y se procedió a realizar la selección de una muestra de 1 kg, de la cual se obtuvo la muestra final a ser analizada en el Laboratorio.

Para los análisis foliares y de raíz se seleccionó al azar 5 individuos por parcela y por especie, para posteriormente obtener las muestras destructivas y realizar la cuantificación de la producción de biomasa. Para el contenido de nutrientes, se utilizó la totalidad de las muestras seleccionadas (5 individuos por especie), separando la parte foliar y la parte radicular, para pasarlas por un molino, donde se obtuvo el volumen de muestra por especie a utilizar en el Laboratorio (5 g por cada muestra de follaje y raíz) para los análisis de absorción de nutrientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cuadro 1 muestra las características químicas y físicas del sustrato utilizado en el ensayo en vivero. El suelo se caracterizó por ser ligeramente ácido y la concentración de los elementos en el suelo se encuentra en condiciones óptimas, algunos un poco elevados, como es el caso del K, P, Cu, Zn y Fe. Las relaciones entre elementos muestran que el contenido de Ca está influyendo de manera determinante, mientras que el porcentaje de materia orgánica se puede considerar como bajo. El análisis físico muestra un suelo con un alto contenido de arcilla y arena y un porcentaje de limo relativamente bajo.

Amarillón (*Terminalia amazonia*)

Para esta especie se encontró diferencias significativas en las variables peso seco del follaje y peso seco radicular, con valores de $p=0,0001$ y $p=0,0013$, respectivamente. Para el diámetro, la altura total y la relación follaje/raíz, no se reflejaron diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 1. Características físicas y químicas del suelo utilizado en el vivero en Pérez Zeledón, zona sur de Costa Rica.

		Análisis químico						Análisis físico									
pH H ₂ O	Acidez	CICE	Ca	Mg	K	P	Cu	Zn	Mn	Fe	M.O.	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K		
			cmol (+),l ⁻¹				μg.ml ⁻¹				%						
6,46	0,25	12,23	10,08	1,2	0,7	234	26	21	9	174	11,8	8,40	14,4	1,71	16,11		
		% Arcilla															
		43,6	% Arena														
			42	% Limo													
				14,4													
				Nombre													
				Arcilloso-arenoso													

En las plantas inoculadas el incremento en diámetro y altura fue de 1,5 y 9%, respectivamente; mientras que en el peso seco del follaje y el peso seco radicular fue de 31,7 y 80%, respectivamente. Es decir, las plantas desarrollaron un mayor volumen de follaje y un mayor sistema radicular, que se refleja directamente en el crecimiento en diámetro y altura; esto posiblemente asociado a una mayor absorción de nutrimentos. Lo anterior demuestra el grado de incidencia del inóculo en esta especie en la fase de vivero, evidenciando una mayor cantidad de raíces que también favorecen la producción de follaje (Cuadro 2).

Melina (*Gmelina arborea*)

La melina mostró diferencias significativas en las variables altura, peso seco del follaje, peso seco radicular y en la relación follaje/raíz; mientras que el diámetro, a pesar de ser mayor, no reflejó diferencias significativas (Cuadro 2). La relación follaje/ raíz muestra el efecto del inóculo sobre el crecimiento foliar y radicular de las plantas micorrizadas con respecto a las testigo. En este caso, se obtuvo una relación significativa en estas 2 variables, que como es de esperar se traduce en una superioridad en la altura y el

Cuadro 2. Efecto de la micorrización de 4 especies forestales en su desarrollo en vivero en Pérez Zeledón, zona sur de Costa Rica.

	Diámetro (mm)	Altura (cm)	Peso follaje (g)	Peso raíz (g)	Relación F/R	Incremento promedio %
<i>Terminalia amazonia</i>						
Con micorriza	6,7±0,23	53,3±0,52	15,8±0,73	6,3±0,72	2,5±0,49	
Sin micorriza	6,6±0,17	48,9±2,22	12,0±0,45	3,5±0,28	3,4±0,30	
Probabilidad	0,7588	0,0666	*0,0001	*0,0013	0,5173	
Incremento %	1,5	9,0	31,7	80,0		30,6
<i>Gmelina arborea</i>						
Con micorriza	7,6±0,30	93,3±0,85	26,9±0,46	6,8±0,41	4,0±0,33	
Sin micorriza	6,91±0,15	87,8±1,56	25,2±0,61	4,7±0,34	5,4±0,50	
Probabilidad	0,0586	*0,0039	*0,0337	*0,0003	*0,0062	
Incremento %	10,0	6,2	6,7	44,7		16,9
<i>Tectona grandis</i>						
Con micorriza	6,2±0,17	40,7±0,54	15,4±0,38	4,9±0,25	3,1±0,25	
Sin micorriza	4,9±0,34	29,7±0,94	10,9±1,05	3,6±0,40	3,1±0,08	
Probabilidad	*0,0030	*0,0001	*0,0005	*0,0075	0,5641	
Incremento %	26,5	37,0	41,3	36,1		35,2
<i>Astronium graveolens</i>						
Con micorriza	3,8±0,19	32,7±0,64	6,6±0,19	4,2±0,19	1,6±0,04	
Sin micorriza	3,4±0,19	21,9±0,65	4,6±0,28	2,2±0,25	2,0±0,22	
Probabilidad	0,1215	*0,0001	*0,0001	*0,0001	*0,0015	
Incremento %	11,8	49,3	43,5	91,0		48,9
Incremento promedio %	12,5	25,0	30,8	63,0		

F/R=Relación follaje/raíz.

diámetro de 10 y 6,2%, respectivamente. El peso seco del follaje y el radicular se incrementó en 6,7 y 44,7%, respectivamente (Cuadro 2).

Teca (*Tectona grandis*)

Esta especie mostró diferencias significativas en todas las variables evaluadas en la fase de vivero, excepto en la relación follaje/raíz. El diámetro, la altura y el peso seco del follaje y el radicular fueron superiores, con incrementos de 26,5, 37, 41,3 y 36,1%, respectivamente (Cuadro 2). Estos resultados justifican la aplicación del hongo.

Ronrón (*Astronium graveolens*)

La respuesta de esta especie al inóculo fue similar a la de las especies anteriores, su efecto fue significativo ($p < 0,05$) en las variables altura, peso seco del follaje, peso seco radicular, con incrementos de 49,3, 43,5 y 91%, respectivamente. Nuevamente se observa que el valor más alto corresponde al de la biomasa radicular, situación que explica que el efecto directo de las micorrizas ocurre primeramente en el sistema radicular, y a partir de ahí, el beneficio para la planta sería teóricamente mayor en el resto de su estructura, debido a una mayor absorción de nutrimentos, que le permite a la planta una mayor eficiencia fisiológica (Cuadro 2). En el caso del diámetro, el incremento fue de 11,8% al aplicarle micorriza, aunque estadísticamente este valor no fue significativo. La relación follaje/raíz si registró diferencias significativas.

En general, las diferencias más evidentes se observan en el incremento en peso seco radicular, como es de esperar cuando hay inoculación de micorrizas, ya que la asociación se establece en las raíces. En promedio la proporción de raíces se incrementó en 63%, seguida del incremento del follaje con 30,8%; mientras que el incremento en altura fue de 25,4%, el doble que el incremento en diámetro, que mostró un crecimiento de 12,5%. A nivel de especie, los mayores incrementos los registró el ronrón con 48,9%, seguido por la teca con 35,2% y el amarillón con 30,6%; la melina

fue la que mostró el menor incremento con 16,9%, en comparación con el testigo.

En vista de que la respuesta de las plantas a la inoculación en vivero fue positiva, la recomendación de utilizar micorrizas en las primeras etapas del crecimiento de los árboles es válida, al menos en las especies en estudio. Otro aspecto a contemplar es la permanencia de estas diferencias en el tiempo, cuando las plantas son llevadas al campo. De ahí la importancia de realizar investigación que permita obtener información sobre los efectos de las micorrizas a largo plazo.

Al analizar las raíces de las plantas al microscopio con inóculo y sin este, se observó que en todas las especies hubo una gran colonización del hongo, contrario a lo que sucedió con las plantas testigo; sin embargo, en las plántulas de melina, tanto las inoculadas como las no inoculadas mostraron vesículas de hongos micorrícicos, quizás porque el ensayo no se hizo con suelo esterilizado, dejando la posibilidad de que alguna micorriza “nativa” presente en el suelo, colonizara las plantas testigo. Cabe aclarar que a pesar de esta situación, en melina siempre se dio un mayor incremento en la mayoría de las variables analizadas con *G. fasciculatum*, reflejando diferencias significativas entre un tratamiento y otro. En cuanto a los porcentajes de mortalidad entre tratamientos, no hubo diferencia, ya que en la fase de vivero todas las plántulas de las 4 especies forestales sobrevivieron.

Absorción neta de nutrimentos en la fase de vivero

El análisis foliar y radicular permitió conocer el contenido nutricional por especie en estos 2 componentes y contrastarlo entre las plantas de cada tratamiento. En amarillón, melina y teca, a pesar de que se dio un leve incremento en los contenidos de los distintos elementos, no se obtuvo diferencias significativas que evidenciaran un efecto consecuencia de la aplicación del inóculo. La única especie que reflejó diferencias significativas en la mayoría de los elementos, tanto en la parte foliar como en la radicular fue el ronrón; específicamente en el análisis radicular, los

elementos donde se obtuvo diferencias significativas fueron Ca, Mg, Cu, Zn, Mn, y Fe; mientras que para la parte foliar fueron K, Mg, Cu, Zn, y Fe (Cuadro 3).

Se considera que uno de los principales aportes de las micorrizas a las plantas es la absorción del P; sin embargo, en este caso a pesar de unos leves incrementos en las especies analizadas, no se observó diferencias significativas, lo anterior puede justificarse por el hecho de que el sustrato tenía $234 \text{ cmol}(+)\cdot\text{l}^{-1}$ de P (Cuadro 1), por lo que el efecto de las micorrizas fue prácticamente nulo. Tinker (1978), afirma que la respuesta en el crecimiento de las plantas usualmente esta relacionado con la nutrición a nivel de P y que es más evidente en suelos de baja fertilidad. Por su parte, John (1996) refiriéndose a las características del sustrato, indica que los efectos beneficiosos de la simbiosis micorrícica son menos obvios cuando las condiciones de vivero son favorables; evidentemente, también existen diferencias propias de las especies forestales.

Sieverding y Toro (1988), indican que no se sabe mucho sobre el papel de las micorrizas en la absorción de macronutrientes, o al menos del K, Ca, Mg y S. Algunos resultados con aplicación de micorrizas reflejan concentraciones mayores de K, resultados catalogados por los mismos autores como incoherentes y difíciles de interpretar. Con respecto a los micronutrientes, existen numerosos informes sobre el incremento de la absorción de Cu y Zn, atribuibles a la infección con micorrizas. Se considera que este aumento podría deberse a la absorción y transporte de nutrientes de las hifas externas del hongo a la planta madre (Kothari et al. 1991). El conocimiento del papel de las micorrizas en la absorción de nutrientes, aparte del P y N, es limitado porque las investigaciones son pocas; sin embargo, es necesario conocer sobre esta cuantificación, ya que las micorrizas a través de las hifas externas pueden proveer a la planta, en adición al P, con N, K, Cu, y Zn en diversos tipos de suelo. Los hongos de micorrizas vesículo-arbuscular contribuyen sustancialmente a la obtención de nutrientes como Mg, B y Fe (Marschner y Dell 1994).

Al relacionar los datos de absorción de nutrientes con los de las variables de crecimiento (altura, diámetro, peso del follaje y radicular), se puede inferir que las plantas utilizaron la mayor parte de los nutrientes para la producción de follaje y raíces, no así para el diámetro. Al analizar cada especie individualmente, melina, teca y ronrón, presentan diferencias significativas en altura, mientras que en diámetro solamente la teca refleja un incremento significativo; lo anterior indica que en comparación con el amarillón estas especies tuvieron una absorción de nutrientes más eficiente.

Esta variabilidad de resultados a nivel de especies es esperada, en vista de que el potencial de las micorrizas como agente biológico involucra varios mecanismos de interacción. Algunos mecanismos están relacionados directamente con la planta; tales como el estímulo del crecimiento vegetal con una contribución nutritiva creciente y por lo tanto una planta más sana; la transformación morfológica del sistema radical; y la inducción o la supresión de los mecanismos de defensa a nivel enzimático. Otros mecanismos se refieren a la presencia de patógenos; los cuales compiten con los hongos micorrícicos por la disponibilidad de alimentos y los sitios de infección. Por último, las micorrizas influyen indirectamente la estructura y la calidad del suelo a través de la modificación de la microflora y un aumento en la materia orgánica (Dalpe 2005, Albertsen et al. 2005).

Efecto de *Glomus fasciculatum* en las 4 especies forestales en el campo

El suelo del sitio donde se estableció la plantación, se caracterizó por ser un suelo ácido ($1,45 \text{ cmol}(+)\cdot\text{l}^{-1}$) y con bajo contenido de P ($0,90 \text{ cmol}(+)\cdot\text{l}^{-1}$), lo cual probablemente esté asociado al contenido de Zn ($1,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), por ser elementos relacionados. Al presentarse poco Zn, el contenido de P tiende a bajar también; además, la relación de bases, la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de MO son muy bajos. El análisis físico reflejó un suelo arcilloso (67% arcilla) con bajos contenidos de arena

Cuadro 3. Efecto de la micorrización con *Glomus fasciculatum* en la absorción neta de nutrimentos en 4 especies forestales en Pérez Zeledón, zona sur de Costa Rica.

Descripción análisis	Elementos					Cu	Zn	Mn	Fe
	N	P	K	Ca	Mg				
<i>Terminalia amazonia</i>									
Análisis foliar	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza	0,0209	0,1284	0,0542	0,1865	0,0150	0,0154	0,0129	0,3698	0,2311
Sin micorriza	0,0409	0,1951	0,0259	0,1293	0,0108	0,0101	0,0077	0,2425	0,1516
Probabilidad	0,1974	0,4138	0,0956	0,1522	0,0607	0,0976	0,1012	0,0976	0,0976
Análisis radicular	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza	0,0445	0,0410	0,0184	0,0388	0,0062	0,0054	0,0055	0,1303	0,0814
Sin micorriza	0,0080	0,0386	0,0146	0,0203	0,0033	0,0030	0,0027	0,0715	0,0447
Probabilidad	0,3188	0,9113	0,6759	0,1396	0,2402	0,1931	0,2001	0,1931	0,1931
<i>Gmelina arborea</i>									
Análisis foliar	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza	0,0636	0,0512	0,1610	0,1443	0,0370	0,0132	0,0266	0,2687	0,5024
Sin micorriza	0,0283	0,0418	0,1322	0,1063	0,0315	0,0117	0,0249	0,2166	0,5328
Probabilidad	0,4045	0,3173	0,4419	0,1941	0,3108	0,0927	0,7192	0,4692	0,7805
Análisis radicular	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza		0,0066	0,0123	0,0014	0,0025	0,0026	0,0030	0,0252	0,4647
Sin micorriza		0,0112	0,0145	0,0009	0,0023	0,0017	0,0020	0,0248	0,7598
Probabilidad		0,4450	0,6909	0,3329	0,8524	0,3318	0,2405	0,9776	0,4049
<i>Tectona grandis</i>									
Análisis foliar	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza	0,0357	0,0325	0,0628	0,0428	0,0061	0,0062	0,0099	0,0520	0,7479
Sin micorriza	0,0071	0,0174	0,0600	0,0362	0,0054	0,0046	0,0051	0,0500	0,3025
Probabilidad	0,2201	0,0946	0,8746	0,5718	0,7088	0,2570	0,0275	0,9129	0,0590
Análisis radicular	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza		0,0128	0,0170	0,0024	0,0023	0,0011	0,0009	0,0152	0,0302
Sin micorriza		0,0041	0,0047	0,0007	0,0014	0,0008	0,0011	0,0014	0,0665
Probabilidad		0,2923	0,2079	0,1800	0,3465	0,3062	0,6708	0,1856	0,1992
<i>Astronium graveolens</i>									
Análisis foliar	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza	0,0481	0,0210	0,0258	0,0208	0,0035	0,0701	0,0093	0,0485	0,0584
Sin micorriza	0,0270	0,0139	0,0243	0,0112	0,0020	0,0497	0,0066	0,0271	0,0414
Probabilidad	0,2356	0,0648	0,7630	*0,0120	*0,0141	*0,0479	*0,0479	*0,0049	*0,0479
Análisis radicular	%.planta ⁻¹					mg.planta ⁻¹			
Con micorriza	0,0146	0,0087	0,0150	0,0030	0,0017	0,0308	0,0041	0,0172	0,0256
Sin micorriza		0,0060	0,0037	0,0015	0,0005	0,0156	0,0021	0,0067	0,0130
Probabilidad		0,2296	*0,0080	0,1190	*0,0078	*0,0202	*0,0202	0,0948	*0,0202

y limo. Estas condiciones, generalmente, están presentes en Ultisoles, que se caracterizan por ser desgastados, con carencia de bases (Ca, Mg, y K) y con contenidos de MO cercanos de 5,47% (Cuadro 4).

Las características físicas y químicas del suelo mostraron serias limitaciones, condición que pudo haber influido en el crecimiento de los árboles y en el efecto de la micorriza utilizada. La efectividad o funcionamiento de un inóculo está condicionada por una serie de factores edáficos que de una u otra forma influyen en el efecto real que las micorizas pueden ejercer sobre una especie o un grupo de especies en particular. Se menciona factores del ambiente suelo, tales como acidez del suelo, temperatura, aireación, humedad, estado nutricional e influencia de la luz; todos aunque distintos afectan la formación y la actividad fisiológica de las micorizas (Hacskaylo 1983).

Los resultados obtenidos en campo reflejan diferencias significativas únicamente para melina en las variables diámetro y altura total. Mientras que para amarillón y ronrón, a pesar de mostrar un crecimiento superior al testigo, tanto en diámetro como en altura, no fueron significativas. En teca el efecto de la micorriza fue nulo (Cuadro 5).

Las razones por las cuales no se obtuvo diferencias significativas para la mayor parte de las especies pueden ser varias, ya que para lograr éxito de la simbiosis entre el hongo y la planta, intervienen muchos factores, que difícilmente se pueden controlar en un solo ensayo. No obstante, en las distintas mediciones realizadas durante el período de evaluación, la tendencia del crecimiento en diámetro y altura de las plantas que fueron micorizadas con *G. fasciculatum* mostraron una superioridad en ambas variables, sobre todo melina que fue la especie que mejor respuesta tuvo al inóculo en el campo, mostrando una superioridad de 38 y 31,7% en diámetro y altura, respectivamente (Cuadro 5). La teca no mostró resultados positivos a la aplicación de micorriza, esto posiblemente debido a las características físicas y químicas del suelo, que limitaron su desarrollo en campo y quizás afectaron

Cuadro 4. Características físicas y químicas del suelo del sitio de plantación de los árboles en el campo en Pérez Zeledón, zona sur de Costa Rica.

		Análisis químico													
pH H ₂ O	Acidez	CICE	Ca	Mg	K	P	Cu	Zn	Mn	Fe	M.O.	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K
5,12	1,45	1,83	0,22	0,11	0,05	0,9	3,8	1,4	1,1	68,0	%	2,00	4,40	2,20	6,60
		Análisis físico													
		% Arcilla													
		67													
		% Arena													
		17													
		% Limo													
		16													
		Nombre													
		Arcilloso													

Cuadro 5. Efecto de la micorrización con *Glomus fasciculatum* en el incremento en diámetro y altura total en 4 especies forestales a los 17 meses de edad en Pérez Zeledón, zona sur de Costa Rica.

Tratamiento	Especie	Medias		N	Comparación de medias	Incremento promedio %
		Diámetro (cm)	Altura (m)			
Con micorriza	Teca	0,73	0,04	4	A	
Sin micorriza	Teca	0,79	0,11	4	A	
Incremento %		-7,6	-63,6			-35,6
Con micorriza	Ronrón	1,26	1,13	4	B	
Sin micorriza	Ronrón	1,25	1,03	4	B	
Incremento %		0,8	9,7			5,3
Con micorriza	Amarillón	2,69	1,79	4	C	
Sin micorriza	Amarillón	2,38	1,47	4	C	
Incremento %		13,0	21,8			17,4
Con micorriza	Melina	6,87	4,11	4	D	
Sin micorriza	Melina	4,98	3,12	4	E	
Incremento %		38,0	31,7			34,9

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), prueba Tukey.

la incidencia del inóculo, particular importancia tiene el pH de suelo, el cual puede desfavorecer el porcentaje de colonización de algunos hongos micorrícicos y el crecimiento de teca (Alvarado et al. 2004). Sin embargo, no significa que este sea un comportamiento generalizado en todos los hongos micorrícicos, ya que otras investigaciones han puesto de manifiesto la acción de las micorrizas en condiciones de suelo con pH bajos. Se menciona que el género *Acaulospora* es extensamente reportado en suelos ácidos y *Gigaspora sp.* parece ser más común en suelos ácidos que *Glomus sp.* Las esporas de algunos hongos vesículo-arbuscular son más tolerantes en condiciones ácidas y con altos contenidos de Al que otros. *Acaulospora sp.*, *Gigaspora sp.* y *Glomus manihotis* son en particular tolerantes, aunque la colonización de la raíz es generalmente

menor en suelos con pH bajos que en suelos con pH altos (Clark 1997).

Al analizar el incremento promedio en diámetro y altura por especie, melina fue la que mostró el mayor porcentaje con 34,9%, mientras que amarillón y ronrón registraron incrementos relativamente bajos (17,4 y 5,3%, respectivamente). En teca los incrementos fueron negativos, registrando -35,6%.

A excepción de la teca, las diferencias entre los tratamientos con micorriza y sin micorriza, se pueden atribuir al efecto de *G. fasciculatum*. Sin embargo, es importante realizar una investigación que involucre nuevamente las especies forestales evaluadas y la micorriza utilizada, y realizarla incluso en regiones distintas. Lo anterior para efectos de validar los resultados obtenidos en esta investigación.

En el ensayo en campo, la melina fue la que mejor respuesta dio a la aplicación de la micorriza, seguida del amarillón y ronrón y aunque el desarrollo juvenil difiere mucho entre una especie y otra, si se aprecia que hay un incremento mayor de la melina en altura. Si se considera, como ya se ha mencionado, que las características edáficas presentes en el sitio podrían ser limitantes para esta especie, podemos inferir que el aumento se debe a la aplicación del inóculo.

Los resultados en el incremento en diámetro fueron similares a los obtenidos en altura. Melina fue la especie que registró mayores valores, seguida al igual que en la altura por el amarillón y el ronrón. En el caso de la teca no hubo efectos positivos en diámetro.

La aplicación de estos resultados en plantaciones con las especies involucradas deben ser utilizadas tomando en cuenta las condiciones bajo las cuales fueron obtenidos. El análisis foliar realizado a las 3 especies que mejor respondieron a la aplicación de micorriza en campo, reflejó

resultados que respaldan las respuestas obtenidas en diámetro y altura (Cuadro 6).

De acuerdo con los datos del análisis foliar existe una tendencia claramente marcada del efecto que pudo ocasionar la aplicación de la micorriza; al analizar los valores de los distintos elementos, los árboles de melina inoculados reflejan contenidos de nutrimentos mayores, en comparación con las plantas sin la micorriza. Los incrementos fueron superiores en todos los elementos, excepto en el N; en general, melina registró un incremento promedio de 32,2%. Estos valores son consistentes con los obtenidos en las variables de crecimiento (diámetro y altura total) en campo (Cuadro 5). En el amarillón se dio un incremento promedio de 19,8%, registrando diferencias en casi todos los elementos, a excepción del Cu que fue igual para ambos tratamientos y Zn que fue menor en las plantas inoculadas.

El ronrón mostró diferencias importantes en K, Mg y en menor grado en Mn, en términos generales el incremento promedio del ronrón

Cuadro 6. Análisis foliar de las plantas inoculadas con *Glomus fasciculatum* y sin la micorriza de 4 especies forestales a los 17 meses de edad en plantación en Pérez Zeledón, zona sur de Costa Rica.

Especie	Elementos									Incremento Promedio %
	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Mn	Fe	
	%					$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$				
Amarillón CM	1,6	0,2	0,17	1,15	0,14	17	14	164	67	
Amarillón SM	1,31	0,18	0,16	0,76	0,13	17	17	91	57	
Incremento %	22,1	11,1	6,3	51,3	7,7	0,0	-17,6	80,2	17,5	19,8
Ronrón CM	2,84	0,31	0,27	0,54	0,09	14	14	27	71	
Ronrón SM	2,84	0,29	0,19	0,57	0,07	14	17	23	81	
Incremento %	0,0	6,9	42,1	-5,3	28,6	0,0	-17,6	17,4	-12,3	6,6
Melina CM	2,77	0,3	0,75	0,9	0,29	14	57	157	129	
Melina SM	2,98	0,27	0,49	0,52	0,27	10	46	132	76	
Incremento %	-7,0	11,1	53,1	73,1	7,4	40,0	23,9	18,9	69,7	32,2
Incremento promedio %	5,0	9,7	33,8	39,7	14,6	13,3	-3,8	38,9	25,0	

fue de 6,6% (Cuadro 6). Los incrementos en el amarillón y el ronrón son consistentes con los incrementos obtenidos en crecimiento diamétrico y altura total para ambas especies. Así, un incremento en la absorción de nutrimentos, en las plantas a las que se les adicionó *G. fasciculatum*, podría llevar a una mejor respuesta en el crecimiento de los árboles, debido a que las micorrizas aumentan el área de exploración del sistema radicular en cantidad y longitud. En general, los mayores incrementos promedio por elemento se registraron en K, Ca, Mn y Fe, con valores de 33,8, 39,7, 38,9 y 25%, respectivamente (Cuadro 6). Las hifas externas de las micorrizas vesículo-arbuscular pueden proveer a la planta un 80% de P, 25% de N, 10% de K, 25% de Zn y 60% de Cu, más de lo normal (Marschner y Dell 1994).

La mortalidad obtenida en ambos tratamientos no mostró una tendencia muy marcada en las plantas inoculadas, el amarillón y la melina presentaron una mortalidad de 19,4 y 16,7%, respectivamente, mientras que en ronrón y teca fue de 13,9 y 30,6%, respectivamente. En las plantas sin inóculo los porcentajes de mortalidad fueron de 13,9, 0, 16,7 y 47,2% para el amarillón, melina, ronrón y teca, en el mismo orden. Los resultados no evidencian efectos positivos que permitan deducir que hubo un efecto claro del inóculo sobre la sobrevivencia de los árboles en campo. Estos porcentajes de mortalidad son debidos más a las condiciones externas (suelo, principalmente) que a la aplicación del inóculo en las plantas. Con los resultados obtenidos se puede concluir que las micorrizas, específicamente la especie *G. fasciculatum*, mejora el crecimiento en las plantas en su fase juvenil (vivero y campo). Además, los análisis de inoculación mostraron que las especies evaluadas son altamente colonizables por hongos micorrícicos, permitiendo la posibilidad de estudiar a futuro otras especies de hongos en estas mismas especies forestales. También es importante recalcar que cuando se inocula hongos micorrícicos en especies forestales, es necesario un período de evaluación mayor al de esta investigación (17 meses), sobre todo en la fase de campo, ya que no existen investigaciones a nivel

nacional o regional que demuestren el papel de las micorrizas a largo plazo en las plantaciones forestales.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. For. Luis Salazar Salazar del Departamento Forestal de Coope Agri R.L. por su valiosa colaboración durante la ejecución de las actividades de campo de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- ALBERTSEN A., RAVNSKOV S., GREEN H., JENSEN D.F., LARSEN J. 2005. Interactions between the external mycelium of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and other soil microorganisms as affected by organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 38:1008-1014.
- ALVARADO A., CHAVARRIA M., GUERRERO R., BONICHE J., NAVARRO J. R. 2004. Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis*) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28 (1):89-100.
- ASBJORNSEN H., MONTAGNINI F. 1994. Vesicular-arbuscular Mycorrhizae inoculum potential effects in the growth of *Stryphnodendron microstachyum* seedlings in a Costa Rican tropical lowland. *Mycorriza* 5:45-51.
- BHOOPANDER G., RUPAM K., MUKERJI K. G. 2005. Effect of the arbuscular mycorrhizae *Glomus fasciculatum* and *Glomus macrocarpum* on the growth and nutrient content of *Cassia siamea* in a semi-arid Indian wasteland soil. *New Forest* 29 (1):63-73.
- BLANCO F., SALAS E. 1997. Micorrizas en agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21 (1):55-67.
- BOLAN N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 34:189-207.
- CLARK B.L. 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192(1):3-68.

- CUERVO J.L. 1997. Efecto de endomicorrizas y rizobacterias en plántulas de dos especies forestales. Tesis de maestría. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. 89 p.
- DALPÉ Y. 2005. Les mycorrhizes: Un outil de protection des plantes mais non une panacée. In: 97^e Assemblée annuelle de la Société de protection des plantes du Québec Gatineau. *Phytoprotection* 86:53-59.
- FORTÍN J., CARLISLE A. 1984. The use of root symbiosis in intensive forestry. Biomass, growth and production. Environment Forestry Service. Quebec, Canada. 96 p.
- HACSKAYLO E. 1983. Researching the potential of forest tree mycorrhizae. *Plant and Soil* 71, 1-8. USDA-Forest Physiology Laboratory. 8 p.
- JOHN S.T. 1996. Arbuscular mycorrhizal inoculation in nursery practice. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 152-158. Available at: <http://www.fcnet.org/proceedings/1996/stjohn.pdf>
- KOTHARI S.K., MARSCHNER H., RAMHELD V. 1991. Direct and indirect effects of VA Mycorrhizae and rhizosphere microorganisms on mineral nutrient acquisition by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. *New Phytologist* 116:637-645.
- MARSCHNER H., DELL B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizae symbiosis. *Plant and Soil* 159:89-102.
- PÉREZ J., READ D. 2004. Los hongos ectomicorrícicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. Asociación Interciencia, Caracas, Venezuela 29 (5):239-247.
- PHILLIPS J. M., HAYMAN D. S. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-160.
- RILLIG M., MUMMEY D.L. 2006. Mycorrhizae and soil structure. *New Phytologist* 171:41-53.
- ROJAS I. 1992. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de tres especies forestales en dos suelos de Guanacaste, Costa Rica. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 90 p.
- ROJAS I., CHAVERRI A. 1992. Efecto de la inoculación ectomicorrícica con carpóforos sobre el desarrollo de plántulas de *Quercus costarricensis*. In: Congreso Forestal Nacional. San José, Costa Rica, Resúmenes. 24-25 p.
- SALAMANCA C.R., DEL RÍO S.M. 1998. Las micorrizas como alternativa para el manejo sostenible de los agroecosistemas tropicales. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia 5-26 p.
- SCHUBLER A., SCHWARZOTT D., WALKER C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.
- SIEVERDING E. 1989. Aspectos de la taxonomía y la identificación de hongos formadores de micorriza vesículo-arbuscular. Investigaciones sobre micorrizas en Colombia Palmira, Colombia, Facultad de Ciencias Agronómicas.
- SIEVERDING E., TORO S. 1988. Influence of soil water regime on VA mycorrhiza, performance of different VAM fungal species with cassava. *J. Agron. Crop Sci.* 161:322-332.
- SUBHAN S., SHAMIRLA P., SARADNI P. 1998. *Glomus fasciculatum* alternates transplantation shock of micropropagated *Sesbania sesban*. *Plant Cell Rep.* 17:268-272.
- SUNDARESAN P., UBALTHOOSE N., GUNASEKARAN P. 1993. Induction and accumulation of phytoalexins in cowpea roots infected with a mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and their resistance to *Fusarium* wilt disease. Madurai Kamaraj University, India 18(2):291-301.
- TINKER P. B. 1978. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. *Physiologia Vegetal* 16:743-751.
- VEGA L. 1964. Efecto de las micorrizas en el crecimiento inicial de coníferas tropicales. Turrialba 14(3):151-155.
- VIJAYA T., SRIVASUKI K.P. 2001. Influence of *Glomus fasciculatum* and *Pisolithus tinctorius* on growth and drought tolerance of some tropical tree species. University Sri Venkateswara. Department of Biotechnology 56:416-441.