

A petri dish containing a blue agar medium with several small, circular, white fungal colonies scattered across the surface.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

TESIS DOCTORAL

**EFECTO *in vitro* DE LOS AGROQUIMICOS  
USADOS EN MANI SOBRE *Sclerotinia minor*  
Jagger, *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Trichoderma* sp.**

A petri dish containing a blue agar medium with several dark, irregular fungal colonies. Some colonies have long, thin, white, hair-like structures extending from them.

**Biól. Silvina Estela Pastor**

Director: Ing. Agr. Guillermo J. March

Co-director: Dr. Rubén González

IFFIVE -INTA

2003

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

## **TESIS DOCTORAL**

**EFECTO *in vitro* DE LOS AGROQUIMICOS USADOS  
EN MANI SOBRE *Sclerotinia minor* Jagger, *Sclerotium  
rolfsii* Sacc. y *Trichoderma* sp.**

**Biól. Silvina Estela Pastor**

Director: Ing. Agr. Guillermo J. March

Co-director: Dr. Rubén González

**IFFIVE -INTA**

**2003**

## INDICE

	<u>Pág.</u>
RESUMEN	1
<b>CAPITULO I</b>	<b>3</b>
INTRODUCCION	4
Herbicidas.	7
Aumento en la incidencia de una enfermedad	8
Disminución de la incidencia de una enfermedad	8
Fertilizantes nitrogenados	11
Ciclos del nitrógeno	11
Fungicidas	13
Hipótesis	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
<b>CAPITULO II</b>	<b>16</b>
MATERIALES Y METODOS	17
Medios de Cultivo	17
Herbicidas	17
Fertilizantes nitrogenados	19
Fungicidas	23
Asimilación de nitrógeno	25
<i>Sclerotinia minor</i>	26
Origen del aislamiento	26
Obtención de cepas genéticamente homogéneas	26
Obtención del micelio para los tratamientos	27
Siembra en medio de cultivo con agroquímicos	27
Producción de esclerocios	27
Prueba de viabilidad	28
<i>Sclerotium rolfsii</i>	28
Origen del aislamiento	28
Prueba de viabilidad	28
<i>Trichoderma</i> sp.	29
Origen del aislamiento	29
Obtención de cepas genéticamente homogéneas	29
Obtención del micelio para los tratamientos	29
Producción de conidios	30
Cuantificación de conidios en cámara de Neubauer	30
Evaluación de crecimiento e inóculo	30
Análisis estadístico de resultados	32
Producción de esclerocios y conidios	32
Curvas de crecimiento	32

<b>CAPITULO III</b>	<b>33</b>
RESULTADOS: Herbicidas	34
<i>Sclerotinia minor</i>	34
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)	34
Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)	36
Viabilidad de esclerocios	37
Colonias en cultivo	38
<i>Sclerotium rolfsii</i>	40
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)	40
Viabilidad de esclerocios	42
Colonias en cultivo	43
<i>Trichoderma sp.</i>	44
Producción de conidios	44
Colonias en cultivo	46
Crecimiento lineal	46
<b>CAPITULO IV</b>	<b>53</b>
RESULTADOS: Fertilizantes nitrogenados	54
<i>Sclerotinia minor</i>	54
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)	54
Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)	56
Viabilidad de esclerocios	57
Colonias en cultivo	57
<i>Sclerotium rolfsii</i>	58
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)	58
Viabilidad de esclerocios	59
Colonias en cultivo	59
<i>Trichoderma sp.</i>	60
Producción de conidios	60
Colonias en cultivo	62
Crecimiento lineal	62
<b>CAPITULO IV Anexo</b>	<b>68</b>
RESULTADOS: Asimilación de nitrógeno	69
<i>Sclerotinia minor</i>	69
Crecimiento lineal	69
Biomasa	70
<i>Sclerotium rolfsii</i>	73
Crecimiento lineal	73
Producción de esclerocios	74
<i>Trichoderma sp</i>	76
Crecimiento lineal	76
Producción de conidios	77

<b>CAPITULO V</b>	<b>82</b>
RESULTADOS: Fungicidas	83
<i>Sclerotinia minor</i>	83
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)	83
Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)	85
Viabilidad de esclerocios	86
Colonias en cultivo	87
<i>Sclerotium rolfsii</i>	89
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)	89
Viabilidad de esclerocios	91
Colonias en cultivo	91
<i>Trichoderma</i> sp	92
Producción de conidios	92
Colonias en cultivo	94
Crecimiento lineal	94
<b>CAPITULO VI</b>	<b>100</b>
DISCUSION	101
Efecto de los herbicidas	101
<i>Sclerotinia minor</i>	101
<i>Sclerotium rolfsii</i>	102
<i>Trichoderma</i> sp.	103
Efecto de los fertilizantes nitrogenados	104
<i>Sclerotinia minor</i>	104
<i>Sclerotium rolfsii</i>	106
<i>Trichoderma</i> sp.	108
Efecto de los fungicidas	109
<i>Sclerotinia minor</i>	109
<i>Sclerotium rolfsii</i>	110
<i>Trichoderma</i> sp.	110
CONCLUSIONES	113
Herbicidas	113
Fertilizantes nitrogenados	113
Fungicidas	114
CONCLUSIONES GENERALES	115
<b>CAPITULO VII</b>	<b>116</b>
BIBLIOGRAFIA	117
AGRADECIMIENTOS	124

## **Efecto de los agroquímicos usados en el cultivo de maní sobre *Sclerotinia minor* Jagger, *Sclerotium rolfsii* Sacc y *Trichoderma* sp.**

### **RESUMEN**

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) de la provincia de Córdoba constituye el 96% de la producción nacional.

El maní es la única especie de leguminosa que fructifica bajo tierra, por lo que sus vainas ya desarrolladas, están expuestas hasta la cosecha a numerosos problemas patológicos, entomológicos y ambientales que causan disminución en los rendimientos.

Si bien en nuestro país el cultivo de maní es afectado por diversos patógenos (virus, hongos y bacterias), las mayores pérdidas en la producción son causadas por hongos que habitan el suelo, habiendo constituido un serio problema desde inicios de la década del '90.

Entre los hongos patógenos que se destacan como agentes causales de estas pérdidas, se encuentran *Sclerotinia minor* Jagger y *Sclerotium rolfsii* Sacc, los que originan las enfermedades del “tizón y “marchitamiento del maní” respectivamente. Estos patógenos forman estructuras de resistencia denominadas *esclerocios* que les permiten perpetuarse en el suelo actuando como inóculo en los años subsiguientes.

La sobrevivencia de estos es afectada por una serie de factores físicos, químicos y biológicos. En cuanto a los factores químicos se han estudiado los efectos colaterales de plaguicidas sobre los patógenos presentes en el suelo y sus antagonistas, sin embargo son escasos los trabajos referidos a la influencia de los fertilizantes y herbicidas. Con respecto a los factores biológicos se destacan los biocontroladores como algunas especies del género *Trichoderma*.

En los últimos 20 años se han producido importantes cambios en el sistema productivo manisero de Argentina, señalándose entre ellos el incremento del uso de agroquímicos especialmente herbicidas, fungicidas y fertilizantes nitrogenados, siendo estos últimos aplicados al maíz, cultivo de rotación.

Si bien los herbicidas son aplicados con el objetivo primario de controlar malezas, los fertilizantes nitrogenados para obtención de mayores rendimientos y los fungicidas para el control de “la viruela del maní”, éstos pueden tener efectos colaterales que resulten en el aumento o disminución de la incidencia y severidad de varias enfermedades de los cultivos; debido a una reducción de las defensas estructurales del hospedante, aumento de la secreción de exudados radicales, estimulación o reducción del crecimiento del patógeno y/o alteración de la microflora competidora con el patógeno potencial.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el presente trabajo tuvo por objetivos evaluar el efecto *in vitro* de los herbicidas, fertilizantes nitrogenados y fungicidas aplicados al cultivo de maní sobre el potencial inóculo de *S. minor* y *S. rolfsii*, y

*Trichoderma* sp. También seleccionar entre los agroquímicos evaluados aquellos más eficientes para el control de estos patógenos siendo menos perjudicial para el antagonista.

Se evaluó el efecto de los herbicidas imazetapir, acetoclor, trifluralina, pendimetalín, metolacoloro y dos mezclas de imazetapir+acetoclor; los fertilizantes nitrato de amonio, fosfato diamónico, nitrato de potasio y urea; y los fungicidas difenoconazole, tebuconazole, flusilazole y carbendazím+epoxiconazole. También se realizó un ensayo de asimilación de nitrógeno para determinar cuál es el compuesto nitrogenado más eficientemente asimilado por estos hongos.

Los resultados indicaron que la producción de esclerocios de *S. minor* fue favorecida por todos los herbicidas evaluados en sus dosis menores, mientras que a mayores el comportamiento fue variable. Las mezclas de herbicidas no afectaron significativamente el número de esclerocios producidos. Sobre *S. rolfsii*, pendimetalín y trifluralina ejercieron efecto negativo a este respecto, pero metolacoloro, acetoclor e imazetapir favorecieron la formación de esclerocios a la mínima concentración y la redujeron en las restantes. *Trichoderma* sp. no fue afectado notablemente, sin embargo con acetoclor e imazetapir incrementaron la formación de conidios con el aumento de su concentración.

Con respecto a los fertilizantes nitrogenados, *S. minor* mostró una correlación positiva entre la forma de nitrógeno disponible y los esclerocios producidos. *S. rolfsii* no fue afectado significativamente, mientras que sobre *Trichoderma* sp. se observó un efecto inhibitorio de la formación de conidios en las concentraciones más altas.

En cuanto a los fungicidas, se observó que difenoconazole favoreció la formación de esclerocios de *S. minor* a medida que aumentaba su concentración, mientras que con tebuconazole, flusilazole y carbendazím+epoxiconazole hubo escasa formación de aquellos en la concentración más baja y alta eficiencia fungicida en las restantes de estas. También se observó que *S. rolfsii* fue afectado notablemente por tebuconazole y difenoconazole y que flusilazole y carbendazím+epoxiconazole lo afectó negativamente solo en las concentraciones más altas. Además la formación de conidios de *Trichoderma* sp. fue afectada por todos los fungicidas, sobretodo por carbendazím+epoxiconazole.

A través del análisis de los estudios realizados se infirió que los agroquímicos (fertilizantes, herbicidas y fungicidas) empleados en el sistema productivo manisero de Córdoba, pueden haber favorecido el incremento del “tizón” (*Sclerotinia minor*) y del “marchitamiento” (*Sclerotium rolfsii*) del maní desde comienzos de la década de '90.

Con el objetivo de lograr un control integrado de estas enfermedades y de acuerdo a los resultados obtenidos, se podría sugerir la aplicación de urea (en sus dosis mínimas), nitrato de potasio, difenoconazole, acetoclor y pendimetalín.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

---

# **Efecto de los agroquímicos usados en el cultivo de maní sobre *Sclerotinia minor* Jagger, *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Trichoderma* sp.**

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCION**

El cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) en la provincia de Córdoba constituye el 96% de la producción nacional de maní, siendo el 4% restante producido principalmente en la provincia de Salta (SAGPyA, 2002).

El maní es la única legumbre que florece sobre la tierra y fructifica debajo de la superficie del suelo. Luego de la polinización, los carpóforos o ginecóforos se alargan y penetran el suelo para desarrollar el fruto (vaina o caja) horizontalmente entre 1 y 8 cm de profundidad bajo la superficie. Entre los 60 y 90 días del ciclo del cultivo, las vainas ya desarrolladas están expuestas hasta la cosecha a numerosos problemas patológicos, entomológicos y ambientales que causan disminución en los rendimientos (Csinos y Bell, 1989).

Una enfermedad ocurre cuando confluyen un hospedante susceptible (planta), un patógeno virulento (hongo, bacteria, virus, etc.) y un ambiente favorable, incluyéndose dentro de este último no solo el clima sino también el hombre y el sistema productivo por él desarrollado. Como consecuencia, se alteran una o varias de las funciones de la planta que desencadenan procesos específicos que caracterizan las enfermedades. Estos varían considerablemente según el agente causal y a veces según la planta misma (Agrios 1991).

Si bien, en nuestro país, el cultivo de maní es afectado por diversos patógenos: (virus, hongos y bacterias) (Marinelli y March, 2002), las mayores pérdidas en la producción son causadas por hongos que habitan el suelo, habiendo constituido un serio problema desde inicio la década del '90.

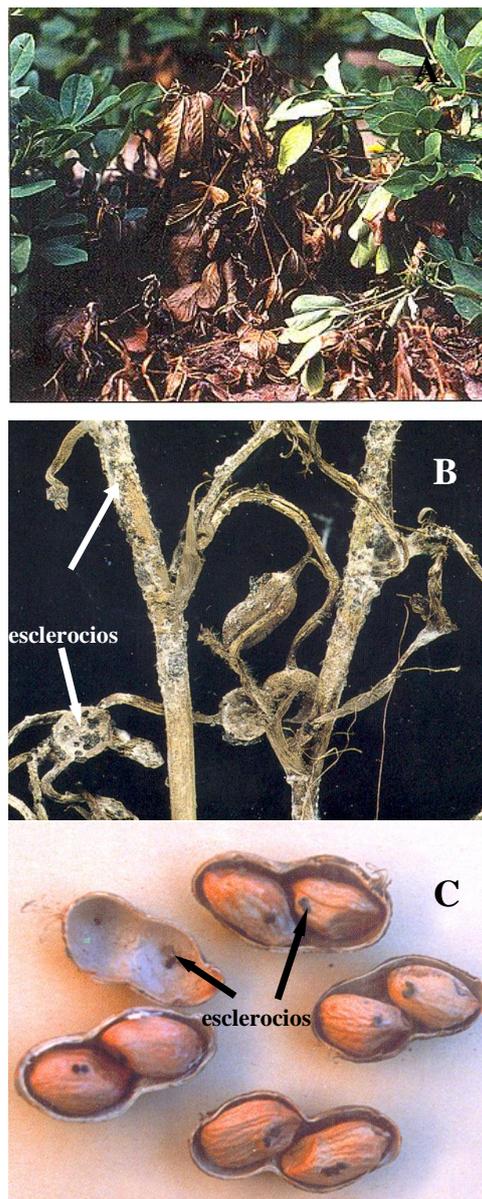
Según evaluaciones realizadas en la campaña agrícola 2000/01 las pérdidas estimadas debidas a podredumbre de frutos y debilitamiento de ginecóforos, causadas por hongos de suelo, fueron estimadas en los 740 kg/ha de granos (March *et al.*, 2001), las que económicamente implican entre 12 y 15 millones de dólares (Marinelli *et al.*, 1998; March *et al.*, 2001). Si a ello le agregamos las pérdidas por enfermedades durante

el cultivo (Marinelli *et al.*, 1998), las pérdidas causadas por hongos del suelo en maní significan una cifra aproximada que oscila entre los 25 y 35 millones de dólares anuales.

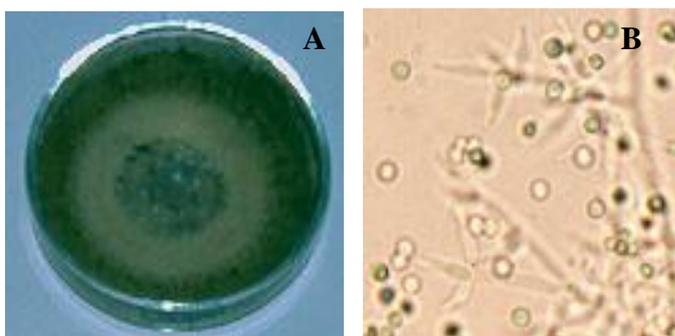
Entre los hongos patógenos que se destacan como agentes causales de estas pérdidas se encuentran *Sclerotinia minor* Jagger y *Sclerotium rolfsii* Sacc: que originan las enfermedades del “tizón y “marchitamiento del maní” respectivamente (fig. 1 y 3).

Estos patógenos pertenecen a dos grupos taxonómicos diferentes, Ascomycotina (*Sclerotinia* sp.) y Basidiomycotina (*S. rolfsii* anamorfo de *Corticium rolfsii*), sin embargo epidemiológicamente poseen un comportamiento similar, debido a sus estructuras de resistencia denominadas *esclerocios* que les permiten perpetuarse en el suelo actuando como inóculo en los años subsiguientes (Frezzi, 1960; Marinelli *et al.*, 1995; Marinelli *et al.*, 1996; Marinelli *et al.*, 2001; Marinelli y March, 1996; Pereyra y Escande, 1994; Mitidieri, 1983; Fernández Valiela,

1979). Además ambos patógenos ocasionan enfermedades monocíclicas (Marinelli *et al.*, 2001; March *et al.*, 1998; Campbell y Madden, 1989), por lo cual aquellos factores ambientales que contribuyan a modificar el potencial inóculo inicial (esclerocios presentes en el suelo), influirán en la severidad final de las enfermedades causadas por ellos.



**Fig. 1:** *Sclerotinia minor*: **A**-Planta enferma. **B**-Esclerocios en ramas. **C**-Esclerocios en frutos.



**Fig. 2:** A - *Trichoderma* sp. B – Conidios y conidióforos.

patógenos presentes en el suelo y sus antagonistas (Ware, 1980); sin embargo son escasos los trabajos referidos a la influencia de los fertilizantes y herbicidas. Entre los factores biológicos se destacan los biocontroladores como algunas especies del género *Trichoderma* (fig. 2) (Menéndez y Godeas, 1995; Papavizas y Lewis, 1989; Mitidieri, 1986; Mónaco, 1990).

En los últimos 20 años se han producido importantes cambios en el sistema productivo manisero de Argentina, señalándose entre ellos el incremento del uso de agroquímicos especialmente herbicidas, fungicidas y fertilizantes nitrogenados. (March y Marinelli, 1995).

La sobrevivencia de los esclerocios es afectada por una serie de factores físicos, como humedad, disponibilidad de O<sub>2</sub> y temperatura; químicos y biológicos. En cuanto a los factores químicos se han estudiado los efectos colaterales de la aplicación de plaguicidas sobre los

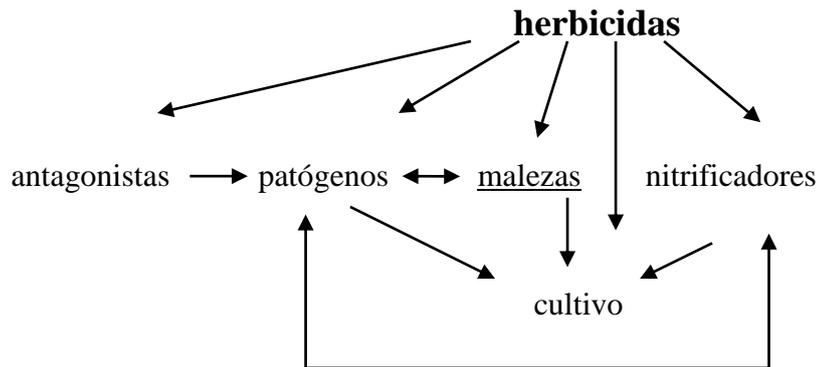


**Fig. 3:** *Sclerotium rolfsii*: A-Planta enferma. B-Esclerocios en ramas. C-Esclerocios en frutos.

## Herbicidas

El uso de productos agroquímicos es una tecnología de amplia difusión a nivel mundial, siendo intensivo en determinados cultivos y con incrementos constantes en algunos rubros, particularmente en herbicidas. (Bruhel, 1989)

*¿Cómo interaccionan los herbicidas con el ambiente biótico?*



**Fig. 4:** Efectos directos e indirectos de los herbicidas sobre los componentes de un patosistema de cultivo. (Lévesque y Rahe, 1992)

Los herbicidas son aplicados a los cultivos con el objetivo primario de controlar malezas; sin embargo, también pueden afectar las propiedades del suelo, de sus microorganismos (Alvarez y Rossi, 1993; Alvarez *et al.*, 1994; Haney *et al.*, 2002; Altman y Campbell, 1977; Reichard *et al.* 1997; Vischetti *et al.*, 2002) y de los cultivos presentes en él (fig. 4). Estos efectos colaterales pueden resultar en el aumento o disminución de la incidencia y severidad de varias enfermedades de los cultivos (Altman y Campbell, 1977; Altman y Rovira, 1989), a través de mecanismos como:

- 1) Reducción de las defensas estructurales del hospedante
- 2) Estimulación del aumento de la secreción de exudados radicales
- 3) Estimulación del crecimiento del patógeno
- 4) Inhibición de la microflora competidora con el patógeno potencial (Altman y Campbell, 1977).

### ***Aumento en la incidencia de una enfermedad***

El fenómeno del aumento en la incidencia de algunas enfermedades debido a la aplicación de herbicidas no está restringido a un grupo de patógenos, de cultivos o de herbicidas, depende de la interacción que se produce entre estos tres y el cambio en el balance biológico resultante de esta interacción. Dicho desbalance es el que activa algunos de los mecanismos que ocasionan la enfermedad (Katan y Eshell, 1973).

Los factores involucrados en el incremento de una enfermedad son:

- a) Estimulación directa sobre el patógeno
- b) Efecto sobre la relación entre el patógeno y otros organismos
- c) Alteración de la virulencia del patógeno
- d) Alteración de la susceptibilidad del hospedante.

a) Estimulación directa del patógeno:

Consiste en la estimulación del crecimiento y reproducción del patógeno y consecuentemente la densidad poblacional. Este factor debe ser evaluado a través de cultivos puros en medios de cultivo líquidos o sólidos o en medio estéril. Los parámetros tenidos en cuenta pueden ser peso de *micelio*, *crecimiento lineal*, *tamaño o zona de inhibición alrededor del disco de papel con herbicida*, *actividad fisiológica* (nutrientes, metabolitos, respiración, etc.) y *reproducción como cantidad de conidios o esclerocios*.

b) Efecto sobre la relación entre el patógeno y otros organismos:

Los organismos antagonistas de los patógenos son muy comunes en el suelo. El fenómeno del antagonismo es el principal motivo por el cual la patogenicidad disminuye en suelos naturales respecto de los estériles. Los posibles mecanismos de antagonismo en el suelo son competencia por los nutrientes, oxígeno y otros requerimientos comunes, liberación de productos tóxicos para los patógenos (antibióticos) y parasitismo directo o predación.

El efecto sobre la virulencia del patógeno (c) y la susceptibilidad del hospedante (d) fueron factores no considerados en este trabajo.

### ***Disminución de la incidencia de una enfermedad***

Los mecanismos que causan la disminución de una enfermedad son el resultado de la acción opuesta de uno o todos los que la incrementan, tratados previamente (Katan y Eshell, 1973). Los mecanismos relacionados son:

- a) Toxicidad directa sobre el patógeno
- b) Alteración de la resistencia del hospedante
- c) Efecto sobre la relación entre el patógeno y otros organismos.

Estudios realizados por Porter y Rud (1980), demostraron que *S. minor* fue suprimido por herbicidas dinitrofenoles como dyanap y dinoseb, al que controlaron cuando fueron aplicados a la postemergencia. En este momento el maní se encontraba en activo crecimiento, lo que permitió que el herbicida permaneciera más tiempo en la superficie del suelo. La persistencia prolongada redujo la volatilidad y fotodescomposición.

Altman (1969), probó 25 herbicidas de amplio uso, los cuales estimularon el crecimiento de *R. solani in vitro*, no determinándose cómo el hongo utilizó los herbicidas como fuente de energía.

Resultados obtenidos por Curl y Funderburk (1965), a través de estudios *in vitro*, indicaron que la atrazina inhibía el crecimiento de *S. rolfsii* a medida que se incrementa su concentración en el medio de cultivo. Además también influyó sobre la esporulación de *Trichoderma viride* en ensayos de campo.

En 1973 Neubauer y Avizohar-Hershenson concluyeron que la trifluralina incrementó la susceptibilidad del algodón a *R. solani* y la actividad saprofítica de los hongos de suelo. Teasdale *et al.* en 1978 observaron que trifluralina era el más perjudicial de las dinitroanilinas para la planta de arveja.

Trabajos realizados previamente (Altman y Campbell, 1977) demostraron que la aplicación de S-etil tiocarbamato (EPTC) aumentó el desarrollo de la enfermedad causada sobre trebol blanco y algodón causado por *S. rolfsii*, promoviendo también su crecimiento en cultivo en medio líquido. Además causó la transformación de *Trichoderma viride* en patogénico, el cual se comporta habitualmente como saprofito en suelo.

De acuerdo a Johnson *et al.* (1994), el uso de herbicidas de presembrado o preemergencia en maní incrementó, en algunos casos, las pérdidas debidas a *S. rolfsii*,

mientras que las de *S. minor* fueron suprimidas por dinoseb.

Para explicar las causas del efecto inductor de algunos herbicidas se han propuesto diversas hipótesis, como: mejor utilización del azúcar -no debido al carbono y nitrógeno suplementario-, prevención de la formación de auto-inhibidores producidos por el hongo o utilización del herbicida como fuente de energía (Katan y Eshell, 1973).

## **Fertilizantes nitrogenados**

Uno de los cambios producidos en el sistema productivo durante la década pasada es el creciente empleo de fertilizantes, debido a la demanda de nutrientes asociada al uso intensivo del suelo y a los mayores rendimientos logrados (Darwich, 1994). Información aportada por el Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Animal y Vegetal (IASCAV) indicó que en el período 1989-94 la importación de fertilizantes como Urea, Nitrato de Amonio y Fosfato diamónico aumentaron 2, 10 y 4 veces respectivamente (Stella, 1995). Actualmente, los datos suministrados por la Cámara Industrial de Fertilizantes y Agroquímicos (CIAFA, 2002) y Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGP y A, 2002) indicaron que de las 29.185.000 ha de área sembradas con los principales cultivos (cereales y oleaginosas), 8.405.000 ha se encuentran tratadas con fertilizantes nitrogenados y mezclas de Nitrógeno, Fósforo y Potasio (NPK).

En el área agrícola de Córdoba las prácticas culturales como incorporación de rastrojo y la rotación de cultivo, además de la aplicación de fertilizantes nitrogenados son frecuentes. Si bien estas prácticas se llevan a cabo con el objetivo primario de mantener la sustentabilidad del suelo y aumentar la producción, favorecen también el incremento de los biocontroladores, contribuyendo con ello a controlar diversas enfermedades por hongos de suelo. Además, numerosos investigadores han evaluado y discutido acerca de la influencia de la fertilización nitrogenada, orgánica e inorgánica, sobre las enfermedades (Leach y Davey, 1935; Reinersten *et al.*, 1984; Lazarovits, 2001; Lakpale *et al.*, 1995; Basu y Sen Gupta, 1996; Dubey, 1959; Huber y Watson, 1970; Thakur y Mukhopadhyay, 1972; Biçici *et al.*, 1994; Huber y Watson, 1974; Huber, 1990; Huber, 1997).

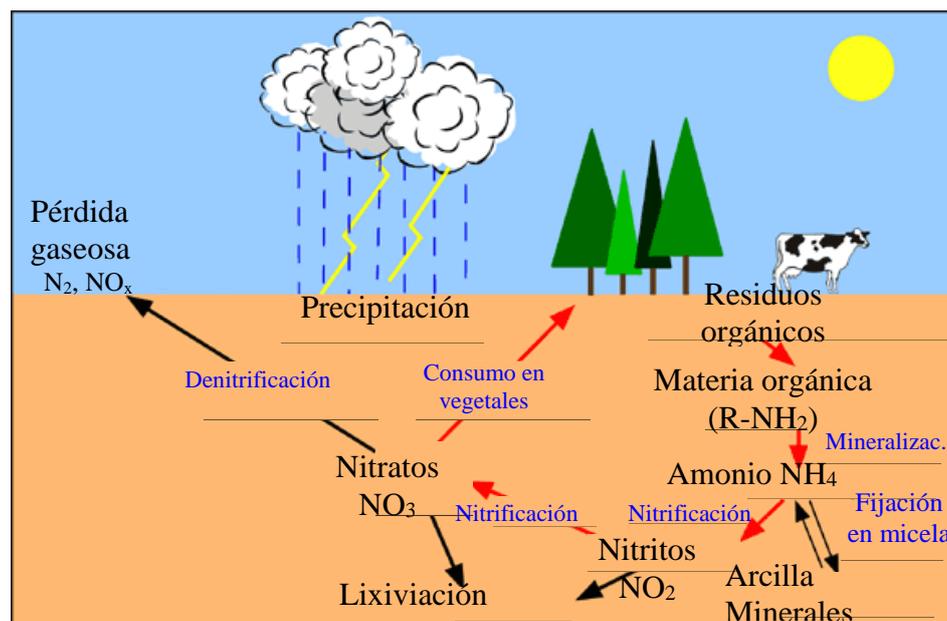
En el caso particular del maní, se aconseja rotaciones con maíz y sorgo (Godoy y Giandana, 1982; Pietrarelli, 1986). Las prácticas culturales se limitan generalmente a una alternancia anual, con lo que epidemiológicamente las enfermedades causadas por

hongos de suelo en este cultivo, se comportan como si se tratara de un monocultivo. Consecuentemente se produce la convergencia de condiciones ambientales favorables, presencia casi permanente de un hospedante susceptible debido a la presencia generalizada de plantas “guachas” de maní en el maíz de la rotación, y hongos patógenos de suelo que se perpetúan. En efecto, teniendo en cuenta que el período de supervivencia de los esclerocios (inóculo) de *S. rolfsii* o *S. minor* supera al de las rotaciones anuales o incluso bienales, se asegura su perpetuación formándose un triángulo de enfermedad conducente a frecuentes epidemias. El maíz con el que se realiza la rotación está generalizado el empleo de fertilizantes nitrogenados, lo que introduce un factor externo al patosistema.

### ***Ciclo del nitrógeno***

El ciclo del nitrógeno representa uno de los ciclos de nutrientes más importantes en el ecosistema terrestre (fig. 5). Es usado por los organismos vivos para producir numerosas moléculas orgánicas complejas, como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Su mayor lugar de almacenamiento es la atmósfera, donde existe en estado gaseoso (principalmente  $N_2$ ). Otro "gran almacén" es la materia orgánica en suelo y el océano. A pesar de su abundancia en la atmósfera es a menudo el nutriente más limitante para el crecimiento de la planta, ya que solamente es asimilado como ión amonio ( $NH_4^+$ ) o ión nitrato ( $NO_3^+$ ).



**Fig. 5:** Ciclo del nitrógeno en el ecosistema. (Pidwirny, 2002)

Las plantas toman principalmente nitrato inorgánico de la solución del suelo. Los animales reciben el nitrógeno por la ingesta de dichas plantas. Finalmente el nitrógeno es convertido nuevamente en sus formas inorgánicas cuando reingresa al ciclo biogeoquímico por acción de los descomponedores, que se encuentran en la capa superficial del suelo, las que modifican químicamente el nitrógeno que se encuentra en la materia orgánica y lo transforman en sales de  $\text{NH}_4^+$ , este proceso se denomina *mineralización* y es llevado a cabo por bacterias, actinomicetes y hongos (Pidwirny, 2002).

El ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) cargado positivamente, normalmente está adsorbido a la superficie de las partículas de arcilla, coloides del suelo. Es liberado de éstas por intercambio catiónico y transformado en su mayoría a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y luego a  $\text{NO}_3^-$  por las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* respectivamente. Ambos procesos se denominan *nitrificación*.

El  $\text{NO}_3^-$  muy soluble en agua, se pierde con facilidad en el sistema hídrico, fluyendo hasta llegar a ríos, lagos y océanos, desde allí es retornado a la atmósfera por la *denitrificación*.

La denitrificación involucra una conversión bacteriana de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ) que difunde a la atmósfera. Es realizado predominantemente por bacterias heterótrofas anaerobias facultativas, como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. Ocurre comúnmente en suelos con anaerobiosis (Pidwirny, 2002; Chagedor, 1998; Kasica, 2002).

Para la interacción parásito-hospedante no hay ningún modelo fisiológico simple. Un amplio rango de interacciones está involucrado, siendo generalmente la *forma nitrogenada* disponible para el patógeno o el hospedante, la que afecta la severidad de la enfermedad o la resistencia a la misma, más que la cantidad de nitrógeno (Huber y Watson, 1974).

Leach y Davey (1935) señalaron la toxicidad del  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  a pH alto (7;8) atribuyéndoselo al efecto tóxico de la liberación de  $\text{NH}_3$ . Algo similar ocurrió al aplicar urea (Chun y Lockwood, 1985; Tsao y Oster, 1981, Henis y Chet, 1967; Lazarovits, 2001), ya que también se liberó  $\text{NH}_3$  como producto de la hidrólisis inicial.

Sin embargo en investigaciones realizadas con *S. rolfsii*, la predominancia de  $\text{NH}_4^+$  a pH más bajos (6,0), que es relativamente no tóxico para éste hongo, resultó en una baja inhibición de la germinación de esclerocios (Punja *et al.* 1982).

Madan y Thinn (1998) afirman que no todas las fuentes de nitrógeno son igualmente aprovechables por los diferentes organismos. No hay una cantidad óptima de demanda de nitrógeno para un aislamiento, esta depende del suministro de carbono en primera instancia.

Por su parte Huber y Watson (1974) reportaron que la disponibilidad de carbono y la forma nitrogenada influyen en el nivel de descomposición de la materia orgánica. La descomposición del rastrojo es más rápida en presencia de  $\text{NH}_4^+$  que en la de  $\text{NO}_3^-$ , probablemente porque induce el incremento de la actividad microbiana y la inducción de enzimas de maceración extracelular. Enfermedades causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Aphanomyces*, *Cercospora*, *Poria* y *Armillaria* pueden ser reducidas por  $\text{NO}_3^-$  y aumentada por  $\text{NH}_4^+$ . Inversamente ocurre con las causadas por *Ophiobolus*, *Diplodia*, *Pythium* y *Streptomyces* (Huber y Watson, 1974)

Según Punja (1989), los mecanismos por los cuales los fertilizantes nitrogenados reducen la enfermedad causada por *S. rolfsii* se dividen en directos e indirectos

- 1) **Directos**
  - a) Efecto sobre el patógeno.
  - b) Efecto sobre el crecimiento de la microflora del suelo, por la cual la actividad del patógeno se reduce.
- 2) **Indirectos**
  - a) Efecto sobre la susceptibilidad del hospedante.
  - b) Efecto de predisposición del patógeno hacia el antagonista.

Los cultivos son fertilizados para obtener productividad y calidad, los efectos de estos se transforman en un tema que debe ser considerado. Actualmente los productos comercializados que estabilizan la forma de nitrógeno hacen posible el control de las enfermedades y mejora de la nutrición del cultivo (Huber y Watson 1974)

## Fungicidas

Datos obtenidos por la CIAFA (CIAFA, 2002) estimaron que 712.000 ha de superficie son tratadas con fungicidas. De este total según la SAGyP (2002) hasta el 15 de febrero del 2002, se han implantado 225.000 ha de maní, las que son tratadas rutinariamente con fungicidas para el control de “la viruela del maní”, por no existir hasta el momento variedades de cultivo resistentes a los patógenos que la originan.

Muchos fungicidas e insecticidas con alta actividad biológica afectan organismos “no específicos” provocando efectos no deseados, como inducción de nuevas enfermedades o el incremento de las recientemente introducidas (Tronsmo, 1989).

La razón de este incremento a través del uso de protección química, también llamado “enfermedades iatrogénicas”, no es bien conocido. No obstante algunos casos de severidad incrementada ha sido documentado como consecuencia de disturbios de los antagonistas naturales como *Trichoderma viride*, un antagonista de patógenos de raíz (Baker y Cook 1982, Tronsmo, 1989).

En efecto, la aplicación de benomil a maní (indicado para la viruela) incrementó la “podredumbre del tallo” causada por *S. rolfsii* (Backman *et al.*, 1975). Además, ensayos realizados por Porter (1980) demostraron que hubo un incremento en la severidad del tizón (*S. minor*) en maní tratado con captafol, similar a lo ocasionado por clorotalonil. Esto lo llevó a suponer que hubo un desbalance en el ecosistema microbiológico bajo la densa canopia de maní, lo que favoreció el crecimiento de *S. minor*, esto significa que fungicidas de amplio espectro pueden alterar el ecosistema en favor de los patógenos “no específico”.

En el presente trabajo se estudiaron los agroquímicos históricamente aplicados y los empleados en la actualidad en el cultivo de maní, como posible factor causal del incremento de las enfermedades causadas por *S. rolfsii* y *S. minor* en los últimos años. Además de acuerdo al efecto observado sobre estos patógenos y uno de sus antagonistas, *Trichoderma* sp., se seleccionaron los agroquímicos ecológicamente recomendables desde el punto de vista del control integrado para su empleo en el futuro.

## **HIPOTESIS**

*Los fertilizantes nitrogenados, herbicidas y fungicidas aplicados al cultivo de maní influyen sobre el potencial inóculo de hongos patógenos presentes en el suelo y sus antagonistas.*

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto *in vitro* de fertilizantes nitrogenados, herbicidas y fungicidas aplicados al cultivo de maní sobre *Sclerotinia minor* Jagger, *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Trichoderma* sp.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Analizar el efecto de los agroquímicos evaluados sobre *S. rolfsii* y *S. minor* a través de técnicas de cultivo *in vitro*, midiendo cantidad de esclerocios producidos (número y peso) a distintas concentraciones de aquellos.
- 2) Analizar el efecto de los agroquímicos evaluados sobre *Trichoderma* sp. a través de técnicas de cultivo *in vitro*, midiendo cantidad de conidios e incremento del diámetro de colonia a distintas concentraciones de los agroquímicos.
- 3) Estudiar el efecto de distintas fuentes de nitrógeno a través de los ensayos nutricionales *in vitro* sobre *Trichoderma* sp., *S. rolfsii* y *S. minor* evaluando la producción de sus estructuras de reproducción.
- 4) Correlacionar los resultados obtenidos en los ensayos de fertilizantes nitrogenados con los estudios nutricionales.
- 5) Sugerir los agroquímicos más convenientes para la aplicación a campo de acuerdo a los resultados obtenidos, siguiendo un criterio de control integrado.

**CAPITULO II**

**MATERIALES Y  
METODOS**

---

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### Medios de cultivo

##### Herbicidas

Los medios de cultivo se prepararon utilizando las formulaciones comerciales de los herbicidas imazetapir (Pivot 10%), trifluralina (Treflan 48%), pendimetalín (Herbadox 33%), acetoclor (Acetoclor 90%), metolacloro (Metolacloro 96%) y una combinación de imazetapir + acetoclor, frecuentemente utilizada como “mezcla de tanque” por los agricultores del área manisera de Córdoba. Las dosis de campo son las recomendadas por la Guía de Productos Fitosanitarios (1995) (tabla 1).

**Tabla 1.** Herbicidas usados en el cultivo de maní y dosis recomendadas a campo.

Herbicidas	Concentración	Dosis recomendadas cm <sup>3</sup> /ha
<b>Trifluralina</b>	(48%)	1500
<b>Pendimetalín</b>	(33%)	1500
<b>Metolacloro</b>	(96%)	1500
<b>Imazetapir</b>	(10%)	1000
<b>Acetoclor</b>	(90%)	1500
<b>Imaz.+Acet. (Combinación 1)</b>	(10+90%)	600+600
<b>Imaz.+Acet. (Combinación 2)</b>	(10+90%)	600+900

Para evaluar *in vitro* concentraciones de estos herbicidas que se correlacionen con las dosis utilizadas a campo, se equiparó la dosis de aplicación comercial para la superficie a sembrar (cm<sup>3</sup>/ha) con la correspondiente a una caja de Petri de 9cm de diámetro (0,00636m<sup>2</sup>), agregándose entonces la cantidad proporcional.

Como en general la lixiviación natural del agua y la degradación físico-química y biológica de los agroquímicos en el suelo causan la disminución gradual de la concentración de estos en el perfil del suelo, el rango de concentraciones evaluadas para los herbicidas incluyó dosis superiores e inferiores a la equivalente de campo.

Los medios de cultivo consistieron en agar papa dextrosa (APG Difco), 39 g/l más 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 ml/l de cada herbicida solo (tabla 2); dos mezclas de herbicidas imazetapir+acetoclor: 0,025/0,025ml/l (1:1) y 0,025/0,0375ml/l (1:1,5) (tabla 3). (Sezgin, E. 1978); y sus respectivos controles.

**Tabla 2.** Equivalencia entre las dosis de herbicidas aplicados en el cultivo de maní según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de herbicida							Equivalente campo (cm <sup>3</sup> /ha)
	Medio de cultivo							
	Solución comercial		i. a. herbicida*					
	ml/l	ul/caja Petri	Trif.	Pend.	Metol.	Imaz.	Acet.	
Control	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
A	0,01	0,15	0,0048	0,0033	0,0096	0,001	0,009	250
B	0,025	0,38	0,012	0,0082	0,024	0,0025	0,022	600
C	0,05	0,76	0,024	0,0165	0,048	0,0050	0,045	1200
D	0,1	1,52	0,048	0,033	0,096	0,01	0,09	2400

\* i. a. : Ingrediente activo

**Tabla 3.** Equivalencia entre las dosis de mezclas de herbicidas imazetapir+acetoclor aplicada en el cultivo de maní según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de mezcla de herbicidas			Equivalente campo (cm <sup>3</sup> /ha)
	Medio de cultivo			
	Solución comercial		i. a. herbicida**	
	ml/l	ul/caja Petri		
Mezcla 1 * (1:1)	0,025+0,025	0,38+0,38	0,0025/0,022	600+600
Mezcla 2 * (1:1,5)	0,025+0,0375	0,38+0,57	0,0025/0,033	600+900

\* 1:1 y 1:1,5 significa la relación de volumen de imazetapir:acetoclor

\*\* : i. a. : Ingrediente activo

Para la preparación de los medios de cultivo se esterilizaron 200 ml de APG (pH 5,5) en frascos de 300 ml a 121°C durante 20 minutos, y se dejaron entibiar en placa de agitación magnética hasta alcanzar los 40°C, momento en el cual se le agregó el herbicida previamente esterilizado. (Bozart y Tweedy, 1971). La esterilización se llevó a cabo filtrando 10 ml de una dilución 1/10 con ultrafiltros



**Fig. 6.** Ultrafiltración de agroquímicos.

de 0,2  $\mu\text{m}$  (Nalgene). El filtrado se mantuvo en un frasco estéril hasta ser agregado al medio (fig. 6).

Para evitar la dispersión de gases tóxicos al laboratorio por manipulación de los productos químicos, se trabajó bajo campana de extracción de gases con flujo de aire estéril mientras fueron diluidos y esterilizados por filtración en condiciones de esterilidad. Este procedimiento fue realizado al momento de elaborar cada medio de cultivo, puesto que algunos compuestos agroquímicos cambian su estructura molecular al ser disueltos en agua, lo que puede alterar su eficiencia o modo de acción a nivel celular. Los medios se fraccionaron colocando 15 ml por caja de Petri de 9 cm de diámetro (fig. 7).



**Fig. 7:** Fraccionado de medios de cultivo en campana de extracción de gases con flujo de aire esteril.

Para los herbicidas volátiles la incubación se efectuó separadamente, colocando los cultivos de cada tratamiento dentro de cajas plásticas herméticamente cerradas.

Los controles consistieron en APG sin herbicida. Los ensayos tuvieron de 3 a 12 repeticiones por tratamiento.

### **Fertilizantes nitrogenados**

Se analizó el efecto de los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo en el cultivo de maíz, por ser este el cultivo más frecuentemente utilizado en rotaciones con maní, en el cual se aplican estos agroquímicos.

Los fertilizantes evaluados fueron urea ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ), fosfato diamónico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ).

Las dosis recomendadas a campo de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  son las sugeridas en la Guía Práctica de Cultivo de Maíz (1997) para la zona pampeana oeste (INTA-Cambio Rural); y las de  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$  y  $\text{KNO}_3$  por el Area de Suelos de la Universidad Nacional de Río Cuarto para la aplicación de los fertilizantes comerciales Urea (48 % N) y Arrancador (26 % N) (tabla 4).

**Tabla 4.** Fertilizantes nitrogenados y dosis recomendadas en el cultivo de maíz según superficie de campo.

<b>Fertilizantes nitrogenados</b>	<b>Dosis recomendada kg N/ha</b>
<b>S</b>	
<b>H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub></b> (Urea 48%N)	57,6 (120 kg urea/ha)
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	40
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	40
<b>KNO<sub>3</sub></b> (Arrancador 26%N)	26 (100 kg/ha)

Para obtener equivalencias entre el rango de concentraciones de los fertilizantes nitrogenados evaluados *in vitro* y las dosis recomendadas para a campo, los cálculos se realizaron de la misma forma que para los herbicidas.

Los medios de cultivo consistieron en 39 g/l de APG más 0,1; 1; 2,5; 5 y 7,5 de H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y KNO<sub>3</sub>, y 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2,5; 5 y 7,5 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Tablas 5, 6, 7 y 8), ya que inicialmente se observó un marcado pico de producción de esclerocios entre las concentraciones 0,1 y 2,5 de este último (tablas 5, 6, 7 y 8).

Se calculó el contenido de C/N de los medio asumiendo que APG contiene 20 g de sacarosa y menos de 2 g de proteínas y oligopéptidos por litro de medio, de lo que surge una relación C/N de 8,4/0,25 (González, R. 2003, comunic. pers.). Para cada tratamiento se sumó el nitrógeno aportado por el fertilizante nitrogenado al del medio base.

Los medios se prepararon según se describió para los herbicidas.

**Tabla 5.** Equivalencias entre las dosis de  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$  aplicadas al cultivo de maíz según superficie de campo, superficie de caja ade Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de $\text{H}_2\text{NCONH}_2$				
	Medio de cultivo				Equivalente campo (kg/ha de N)
	g/l	g/caja Petri	g N/l	C/N	
Control	0,0	0,0	0,25	33,6	0,0
A	0,1	$1,5 \times 10^{-3}$	0,296	28,3	2,3
B	1,0	$1,5 \times 10^{-2}$	0,71	11,8	23
C	2,5	0,0375	1,4	6,0	57,5
<b>D</b>	<b>5,0</b>	<b>0,075</b>	<b>2,55</b>	<b>3,29</b>	<b>115</b>
E	7,5	0,1125	3,7	2,27	172,5

Nota: Los valores en rojo corresponden a la concentración de la dosis de campo.

**Tabla 6.** Equivalencia entre las dosis de  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  aplicadas al cultivo de maíz según superficie de campo, superficie de caja ade Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$				
	Medio de cultivo				Equivalente campo (kg/ha de N)
	g/l	g/caja Petri	g N/l	C/N	
Control	0,0	0,0	0,25	33,6	0,0
A	0,1	$1,5 \times 10^{-3}$	0,271	30,9	0,49
AB	0,5	$7,5 \times 10^{-3}$	0,0355	23,6	2,45
B	1,0	$1,5 \times 10^{-2}$	0,46	18,2	4,99
BC	1,5	$2,25 \times 10^{-2}$	0,565	14,8	7,35
C	2,5	0,0375	0,77	10,9	12,47
D	5,0	0,075	1,3	6,42	24,94
<b>E</b>	<b>7,5</b>	<b>0,1125</b>	<b>1,82</b>	<b>4,61</b>	<b>37,41</b>

Nota: Los valores en rojo corresponden a la concentración de la dosis de campo

**Tabla 7.** Equivalencia entre las dosis de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  aplicadas al cultivo de maíz según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*

Tratamiento	Concentración de $\text{NH}_4\text{NO}_3$				
	Medio de cultivo				Equivalente campo (kg/ha de N)
	g/l	g/caja Petri	g N/l	C/N	
Control	0,0	0,0	0,25	33,6	0,0
A	0,1	$1,5 \times 10^{-3}$	0,285	29,4	0,8
B	1,0	$1,5 \times 10^{-2}$	0,6	14,0	8,0
C	2,5	0,0375	1,12	7,5	20
<b>D</b>	<b>5,0</b>	<b>0,075</b>	<b>2,0</b>	<b>4,2</b>	<b>40</b>
E	7,5	0,1125	2,87	2,9	60

**Nota:** Los valores en rojo corresponden a la concentración de la dosis de campo

**Tabla 8.** Equivalencia entre las dosis de  $\text{KNO}_3$  aplicadas al cultivo de maíz según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*

Tratamiento	Concentración de $\text{KNO}_3$				
	Medio de cultivo				Equivalente campo (kg/ha de N)
	g/l	g/caja Petri	g N/l	C/N	
Control	0,0	0,0	0,25	33,6	0,0
A	0,1	$1,5 \times 10^{-3}$	0,263	31,9	0,34
B	1,0	$1,5 \times 10^{-2}$	0,38	22,1	3,38
C	2,5	0,0375	0,575	14,6	8,46
D	5,0	0,075	0,9	9,3	16,8
<b>E</b>	<b>7,5</b>	<b>0,1125</b>	<b>1,225</b>	<b>6,8</b>	<b>25,4</b>

**Nota:** Los valores en rojo corresponden a la concentración de la dosis de campo

## Fungicidas

Se evaluó el efecto de los fungicidas aplicados al follaje para el control de la viruela del maní causada por (*Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum*): Tebuconazole (Folicur 25%), Difenoconazole (Bogard 25%), Flusilazole (Winner 40%) y Carbendazím+Epoxiconazol (Duett 12,5%). Las dosis de campo son las recomendadas por la Guía de Productos Fitosanitarios (2001) (tabla 9)

**Tabla 9.** Fungicidas usados en el cultivo de maní y dosis recomendadas a campo

Fungicidas	Concentración	Dosis recomendadas (cm <sup>3</sup> /ha)
Tebuconazole	25%	750
Difenoconazole	25%	300-400
Flusilazole	40%	150
Carbendazím+Epoxiconazole	12,5%	750

Al igual que para herbicidas y fertilizantes, el rango de concentraciones evaluado en el laboratorio se determinó correlacionando la dosis de aplicación a campo (cm<sup>3</sup>/ha) con la cantidad suficiente para (c.s.p) la superficie de una caja de Petri (tablas 10, 11, 12 y 13). Dada las diferentes dosis recomendadas para el control de la viruela, cada fungicida tuvo su propio rango de concentraciones (tablas 10, 11, 12 y 13).

**Tabla 10.** Equivalencia entre las dosis de tebuconazole aplicados para el control de la viruela del maní, según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de tebuconazole			Equivalente campo (cm <sup>3</sup> /ha)
	Medio de cultivo		i. a. fungicida (mg/l)	
	Solución comercial ml/l	ul/caja Petri		
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
A	0,01	0,15	0,0025	250
B	0,02	0,31	0,005	500
<b>C</b>	<b>0,03</b>	<b>0,47</b>	<b>0,0075</b>	<b>750</b>
D	0,04	0,62	0,01	1000

**Note:** Los valores en rojo corresponden a la concentración de la dosis de campo

**Tabla 11.** Equivalencia entre las dosis de difenoconazole aplicados para el control de la viruela del maní, según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de difenoconazole			
	Medio de cultivo			Equivalente campo (cm <sup>3</sup> /ha)
	Solución comercial		i. a. fungicida (mg/l)	
ml/l	ul/caja Petri			
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
A	0,005	0,078	0,0012	125
<b>B</b>	<b>0,01</b>	<b>0,15</b>	<b>0,0025</b>	<b>250</b>
<b>C</b>	<b>0,02</b>	<b>0,31</b>	<b>0,005</b>	<b>500</b>
D	0,03	0,47	0,0075	750

Note: Los valores en rojo corresponden a la concentración de la dosis de campo

**Tabla 12.** Equivalencia entre las dosis de flusilazole aplicados para el control de la viruela del maní, según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de flusilazole			
	Medio de cultivo			Equivalente campo (cm <sup>3</sup> /ha)
	Solución comercial		i. a. fungicida (mg/l)	
ml/l	ul/caja Petri			
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
A	0,002	0,03	4 x 10 <sup>-4</sup>	50
B	0,004	0,06	8 x 10 <sup>-4</sup>	100
<b>C</b>	<b>0,006</b>	<b>0,09</b>	<b>1,2 x 10<sup>-3</sup></b>	<b>150</b>
D	0,008	0,12	1,6 x 10 <sup>-3</sup>	200

Note: Los valores destacados corresponden a la concentración de la dosis de campo

**Tabla 13.** Equivalencia entre las dosis de carbendazím+epoxiconazole aplicados para el control de la viruela del maní, según superficie de campo, superficie de caja de Petri y medio de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Concentración de carbendazím+epoxiconazole			
	Medio de cultivo			Equivalente campo (cm <sup>3</sup> /ha)
	Solución comercial		i. a. fungicida (mg/l)	
ml/l	ul/caja Petri			
Control	0,0	0,0	0,0	0,0
A	0,01	0,15	0,0012	250
B	0,02	0,31	0,0025	500
C	<b>0,03</b>	<b>0,47</b>	<b>0,0037</b>	<b>750</b>
D	0,04	0,62	0,0054	1000

**Nota:** Los valores destacados corresponden a la concentración de la dosis de campo

### Asimilación de nitrógeno

Con el objetivo de identificar al compuesto nitrogenado asimilado más eficientemente para el crecimiento de las especies fúngicas de este estudio, se probó la base mineral de Murashige Skoog (MS) sin N, con la fuente de carbono y suplementada con distintas fuentes de nitrógeno (tabla 14).

Las fuentes de nitrógeno evaluadas fueron nitrato, amonio y urea empleando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; KNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub>. También se evaluó nitrógeno orgánico adicionando caseína y tripteína en medios diferentes según se indica para *Rhizobium TY* (Bering, 1974) y en *Medio para hongos* (Merck 1982) respectivamente, cuyos contenidos de nitrógeno coincidían aproximadamente con el requerimiento estimado para los experimentos (tabla 14).

La relación C/N necesaria en los medios de cultivo se calculó teniendo en cuenta el aporte de N de los componentes agregados.

Los organismos de suelo poseen una relación C:N entre 5:1 a 8:1, si la mayoría de las células microbianas contienen 45% de C, esto representa un contenido de nitrógeno entre 9 y 6 % (Paul y Clark, 1989).

Asumiendo una relación C/N de 6:1, el nitrógeno requerido para asimilar la fuente de carbono agregada por litro de medio de cultivo fue **0,63 gN/l**.

Los medios fueron ajustados a pH 5,6 ± 0,1, esterilizados durante 15 min. a 121°C, excepto el suplementado con H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub> y la que se agregó esterilizada por filtración. Se fraccionaron a razón de 10 ml por caja de Petri.

**Tabla 14.** Ensayo de fuentes de nitrógeno.

Composición medio de cultivo	Base	Fuente de nitrógeno	Concentración de compuesto nitrogenado	
			Caja de Petri (g/caja)	Medio de cultivo (g/l) <sup>4</sup>
1	MS sin N	tripteína	0,075	5
2	MS sin N	caseína	0,075	5
3	MS sin N	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0299	2,99
4	MS sin N	KNO <sub>3</sub>	0,0476	4,76
5	MS sin N	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0,0141	1,41
6	MS <sup>1</sup>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,165	16,5
		KNO <sub>3</sub>	0,19	19
7	MS sin N	--	--	--
8	Control <sup>2</sup>	--	--	--
9	APG <sup>3</sup>	--	--	--

1: Agar Murashige & Skoog.

2: Agar agua destilada.

3: Agar papa glucosado.

4: La cantidad de compuesto nitrogenado agregado corresponde a 0,63 g N/l.

### *Sclerotinia minor*

#### **Origen del aislamiento**

Los primeros esclerocios se obtuvieron de plantas de maní afectadas por tizón en un cultivo experimental destinado al manejo de esta enfermedad. A fin de realizar los estudios a partir de aislamientos con idénticas características genéticas, se obtuvieron esclerocios en laboratorio partiendo de los provenientes de dichas plantas enfermas.

#### **Obtención de cepas genéticamente homogéneas**

Cinco esclerocios obtenidos de las plantas de campo afectadas por tizón, fueron esterilizados con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 5% (55gr/Cl activo) durante un minuto, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, sembraron en una caja de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo 15 ml de APG, e incubaron en oscuridad a 21°C. Cuando la colonia desarrollada alcanzó 2 cm de diámetro aproximadamente, de una sola de ellas se tomaron discos de agar con micelio de 0,5 cm y se transfirieron a

cajas de Petri con 15 ml de APG, e incubaron en oscuridad a 21°C. Cuando se obtuvieron los nuevos esclerocios se recolectaron y conservaron a 4°C hasta su utilización.

### Obtención del micelio para los tratamientos

A partir de los esclerocios genéticamente homogéneos, multiplicados en el laboratorio, se obtuvieron colonias desarrolladas sobre APG. Cuando esta midió 2 cm de diámetro aproximadamente, se tomaron discos de agar de 0,5 cm. El micelio obtenido se transfirió a cajas de Petri con 15 ml de APG para obtener *colonias* para los experimentos.

A fin de evitar la posible inducción de variaciones genéticas generadas por los sucesivos repiques *in vitro*, se realizaron como máximo cuatro transferencias desde que los esclerocios fueron traídos del campo hasta el momento de la siembra en los medios diferenciales.

### Siembra en medio de cultivo con agroquímicos

En el centro de cada caja de Petri utilizada en las distintas evaluaciones, se sembraron discos de agar de 0,5 cm de diámetro extraídos de la zona de activo crecimiento de *colonias madres* de 4-5 días de edad.

Las cajas se sellaron con film parafinado (Parafilm) e incubaron a 21°C en oscuridad durante 22 días. Durante los primeros 15 días las cajas estuvieron selladas con el film, siguiendo un período de 7 días sin el film para favorecer la formación de esclerocios.

### Producción de esclerocios

Los esclerocios producidos fueron recolectados por raspado superficial del medio y mantenidos a temperatura del laboratorio (20-25°C) durante su deshidratación (fig. 8).

Como los esclerocios tenían forma y tamaño irregular (entre 0,5-5mm de diámetro) y a veces se agregaron, su producción se conservaron en sobres de papel sulfito a 4°C.



**Fig. 8.** Recolección de esclerocios

### Prueba de viabilidad

Los esclerocios de cada tratamiento fueron esterilizados con hipoclorito de sodio comercial (55gr/Cl activo) al 3% durante un minuto y lavados dos veces con agua destilada a estéril empleando un equipo de filtración Millipore y bomba de vacío para la extracción del agua (fig. 9).



**Fig. 9.** Equipo de filtración empleado para esterilizar los esclerocios previo al ensayo de viabilidad

Los esclerocios obtenidos se sembraron a razón de 12 y 18 esclero-

cios por repetición en cajas de Petri de 9 cm con 10 ml de agar-agua, se sellaron con film parafinado e incubaron a 21°C en posición invertida. De esta manera las hifas crecen hacia la tapa de la caja facilitando la evaluación de la viabilidad a los siete días de incubación.

### *Sclerotium rolfsii*

#### Origen del aislamiento

Los primeros esclerocios se obtuvieron desde plantas de maní afectadas por marchitamiento en un cultivo experimental destinado al manejo de esta enfermedad.

A fin de realizar los estudios sobre aislamientos con idénticas características genéticas, se obtuvieron esclerocios en laboratorio a partir de un esclerocio de campo.

La metodología seguida para la obtención de la cepa genéticamente homogénea de esclerocios, el micelio para los tratamientos y la siembra en los medios con agroquímicos, fue la misma que para *S. minor*, excepto que debido a la sensibilidad de *S. rolfsii* a la hipoxia, las cajas de Petri fueron selladas con polietileno termocontráctil (Resinite) el cual permite el intercambio gaseoso. Además los cultivos se incubaron a 28°C.

### Prueba de viabilidad

Los esclerocios de cada tratamiento, fueron recolectados y secados a temperatura ambiente. Luego de esterilizarlos con el mismo procedimiento que para *S. minor* (fig. 9),

se sembraron a razón de 10 esclerocios por repetición, en cajas de Petri con 10 ml de agar-agua, sellados con polietileno termocontráctil (Resinite) e incubados a 28°C. La evaluación de viabilidad se realizó a los cuatro días.

### *Trichoderma* sp

#### **Origen del aislamiento**

En este estudio se utilizó un aislamiento proveniente del banco de cepas del Laboratorio de Investigaciones en Micología de INTA Castelar, cuya acción antagonista frente a *S. rolf sii* fue evaluada por Formento (1998).

Para producir cepas genéticamente homogéneas se realizaron cultivos monospóricos, uno de los cuales fue multiplicado para producir el micelio sembrado en los medios diferenciales.

#### **Obtención de cepas genéticamente homogéneas**

De las cepas originales evaluadas por Formento, se obtuvieron colonias de las que se recolectaron los conidios producidos por raspado superficial de esta, empleando una espátula de Drigalsky. Fueron suspendidos en 10 ml de agua destilada estéril. Con un ml de la suspensión a una concentración 1/10 se realizó un estriado sobre agar agua en cajas de Petri, incubándose invertidas a 28°C durante 24 hs.

La extracción de los conidios germinados se llevó a cabo bajo una lupa estereoscópica, utilizando aguja hipodérmica descartable cuyo extremo fue doblado manualmente en sentido opuesto al orificio del canal de la misma (teniendo en cuenta que el filo de las agujas se halla cortado al sesgo). Cada conidio germinado y extraído fue sembrado sobre APG. La colonia de origen monospórico se conservó hasta su utilización colocando agar con micelio en tubos eppendorfs con glicerol 12% estériles a -70°C y en APG a 4°C

#### **Obtención del micelio para los tratamientos**

A partir del micelio desarrollado de los cultivos se formó una colonia sobre APG, siendo esta la colonia madre del micelio utilizada para las siembras en los tratamientos.

La siembra sobre medios con agroquímicos fue realizada siguiendo el mismo procedimiento que para *S. rolf sii*, excepto que los discos de agar con micelio fueron

sembrados sobre el medio de cultivo cubierto por un disco de papel celofán estéril del mismo diámetro que la caja de Petri.

### **Producción de conidios**

Para recolectar los conidios producidos se agregaron inicialmente 10 ml de solución de Powell y Norris (PyN) sobre la colonia desarrollada: formalina 0,5%, punta de espátula cada 100 ml de Sodio dodecil sulfato (SDS) a pH 7,2-7,4 (Erhardt, 1981) y se barrió la superficie del medio con espátula de Drigalski. La suspensión obtenida fue filtrada a través de una gasa doble capa. Para lavar el pellet retenido por la gasa y la superficie del medio se utilizaron otros 20 ml de la solución PyN.

Se colocó 1 ml de cada suspensión filtrada en tubos Eppendorf estériles y se realizaron diluciones seriadas hasta 1/100, las que fueron utilizadas para el recuento en cámara de Neubauer a microscopio óptico.

### **Cuantificación de conidios en cámara de Neubauer**

Se transfirió una pequeña cantidad de la suspensión diluida mediante una pipeta Pasteur, tocando el borde del cubreobjeto hasta llenar cada cámara de Neubauer.

El conteo se inició en una de las cámaras, contando los conidios presentes en todas las celdillas de una cuadrícula de triple línea (1 mm), repitiéndose el procedimiento en las cuatro esquinas y el centro. En la periferia de la cuadrícula se contaron aquellos conidios que tocaban la línea media de los bordes superior e izquierdo y no los de los bordes inferior y derecho (Sigma Catalogue, 1994; Lecuona, 1996).

Para estimar los conidios por caja se realizaron los siguientes cálculos:

$$N \times 25 \times 10^4 \times VS$$

N = Cantidad promedio de conidios por cuadrícula de 1mm x Factor de dilución

25 = Cantidad de cuadrículas 1mm

$10^4$  = Conversión a  $\text{cm}^3$  (una cuadrícula de 1mm con cubreobjeto equivale a  $0,1\text{mm}^3$  o  $10^{-4}$ )

### **Evaluación de crecimiento e inóculo**

Los parámetros evaluados fueron:

a) Ensayos con agroquímicos

- 1) Producción de esclerocios para *S. rolfsii* y *S. minor* (número y peso total por caja Petri respectivamente).

- 2) Crecimiento lineal y producción de conidios para *Trichoderma sp.* (Katan & Eshell 1973).

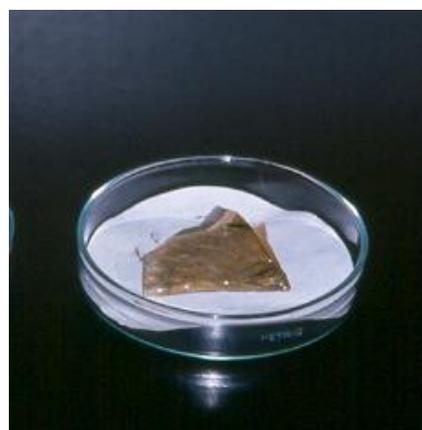
b) Ensayo de asimilación de nitrógeno:

- 1) Biomasa y producción de esclerocios para *S. minor*, *S. rolfsii* respectivamente y de conidios *Trichoderma sp.*
- 2) Crecimiento lineal para los tres hongos evaluados.

El crecimiento se determinó a través de la medición diaria de los diámetros perpendiculares de la colonia, los que fueron promediados y graficados. En las evaluaciones de *Trichoderma sp.* en el ensayo de agroquímicos los diámetros se midieron cada 24 hs y en el de asimilación de nitrógeno se obtuvieron tomando dos mediciones diarias con 6-8 hs intermedias, hasta que la colonia llegó al borde de la caja o detuvo su crecimiento. Los horarios de la segunda, cuarta, sexta, octava y décima medición varió de acuerdo al horario de la siembra del micelio (matutino o vespertino).

Para determinar la biomasa se cortaron discos de papel celofán de 9 cm de diámetro, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante una hora y se colocaron cubriendo el medio de cultivo en cada caja de Petri, a fin de que la colonia desarrollada permanezca separada del medio (Butterfield, 1977; Mwanza, 1999). En el centro se sembró un disco de agar con micelio del hongo correspondiente, según se describió previamente.

Al final del cultivo se levantó el celofán con la colonia desarrollada sobre él, utilizando pinzas de disección, y se colocó plegado dentro de una caja de Petri sobre un papel de filtro del igual diámetro. A continuación se secaron a 60°C en estufa con circulación de aire durante 72 hs, y se pesó en balanza de precisión (fig. 10).



**Figura 10.** Colonia desarrollada sobre papel

La cantidad de esclerocios producidos se obtuvo empleando un analizador de imágenes que consta de una cámara filmadora Panasonic, equipo de informática y el software procesador de imágenes Optimas (fig. 11).

La producción de conidios se estimó según se describió previamente en “Cuantificación de conidios en cámara de Neubauer”.

Estudios preliminares del ensayo de asimilación de nitrógeno permitieron observar que *S. minor* no formaba, en estos medios definidos, esclerocios consistentes y suficientemente voluminosos como para ser contados, por lo que solo se evaluó su biomasa; y a su vez que esta no era posible evaluarse para *Trichoderma* sp. y en *S. rofsii*, debido a su capacidad celulolítica, determinándose consecuentemente para estos últimos la producción de conidios y esclerocios respectivamente.



**Fig. 11.** Analizador de imágenes macro y microscópicas.

### **Análisis estadístico de resultados**

#### **Producción de esclerocios y conidios**

La producción de esclerocios y conidios fue analizada a través del Análisis de la Varianza y test de Bonferroni, empleando el Software Sigma Stat.

#### **Curvas de crecimiento**

Los curvas de crecimiento de diámetro de colonia fueron analizadas a través de la comparación de errores estandar (desvíos estándar) asociados al parámetro  $r$  de cada curva, según Campbell y Madden (1989).

Para calcular  $r$  se empleó el programa estadístico Minitab.

Cada parámetro estimado para una curva de progreso tiene asociado en error estándar (desvío estándar) que puede ser usado en comparaciones estadísticas. Si  $\theta_1$  y  $\theta_2$  representan los parámetros estimados para dos diferentes curvas, por ejemplo  $r_1$  y  $r_2$ , entonces un intervalo de confianza para la diferencia entre los dos parámetros puede ser estimado por:

$$(\theta_1 - \theta_2) \pm t \left[ \frac{p}{2} \cdot \overbrace{n_1 + n_2 - (2 \times p)}^{\text{g}^\circ \text{ de libertad}} \right] \cdot S$$

$\theta_i$  = tasa de incremento de  $r_i$

$p$  = N° de parámetros

$n$  = N° de observaciones de las diferentes curvas

$S$  = desvío standard

$t$  = valor  $t$  de tabla para  $n_1 + n_2 - (2 \times p)$  grados de libertad, a un nivel de significación de 0,05%

El desvío standard se calculó aplicando:

$$S = \sqrt{s(\mathbf{d})_1^2 + s(\mathbf{d})_2^2}$$

$s(\mathbf{d})_i$  = desvío standard obtenido en el análisis de regresión por el programa Minitab

Si el intervalo de confianza no incluye 0, se puede rechazar la hipótesis nula de que los dos parámetros son iguales en favor de la hipótesis alternativa de que son diferentes.

Para el análisis de las curvas de crecimiento en los ensayos de asimilación de nitrógeno, se tomaron en cuenta solo las mediciones comprendidas en las pendientes, no así las del período de latencia (inicial) y en el de capacidad de carga (final).

**CAPITULO III**

**RESULTADOS:  
Herbidas**

---

## CAPITULO III

### RESULTADOS: Herbicidas

#### *Sclerotinia minor*

#### Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)

El número promedio de esclerocios producidos por caja de Petri en cada medio APG suplementado con los herbicidas usados en el cultivo de maní, constan en las tablas 15 y 16, graficándose en la fig. 12 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla. 15.** Número de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

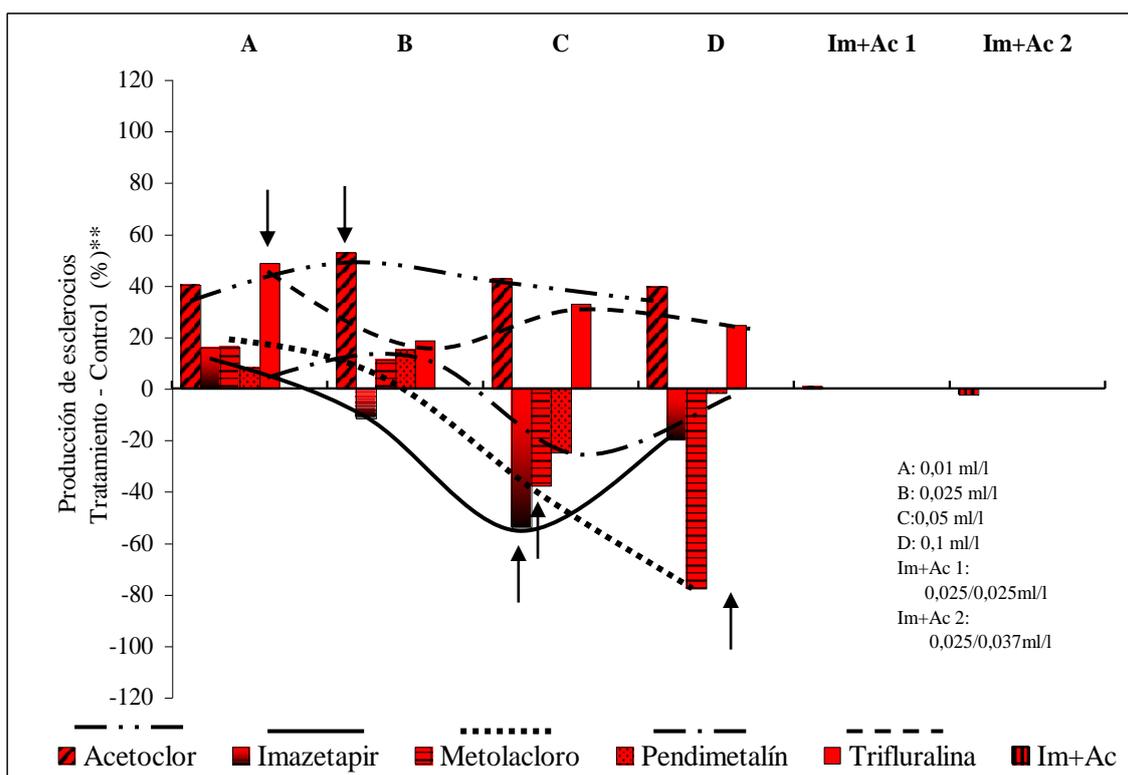
Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)									
Herbicidas	Co Control	A 0,01ml/l	A-Co (%)	B 0,025ml/l	B-Co (%)	C 0,05ml/l	C-Co (%)	D 0,1ml/l	D-Co (%)
Acetoclor	369	517	40,3	565	<u>53,1</u>	527	42,8	516	39,8
Imazetapir	436	506	16	385	-11,5	201	<u>-53,9</u>	350	-19,7
Metolacoloro	563	655	16,3	627	11,3	351	<u>37,6</u>	126	<u>-77,6</u>
Trifluralina	348	518	<u>48,8</u>	414	18,9	463	33	434	24,7
Pendimetalín	606	656	8,2	698	15,2	457	-24,7	596	-1,6

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y los destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 16.** Número de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas combinados.

Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)					
Herbicidas	Co Control	Mezcla 1 0,025/0,025ml/l	1-Co (%)	Mezcla 2 0,025/0,0375ml/l	2-Co (%)
Imazetapir/Acetoclor	641	649	1,2	625	-3,1

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 12.** Producción (Nº/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. minor* en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas respecto al control.

En los tratamientos A y B con pendimetalín la producción de esclerocios superó al control entre 8,2 y 15,2%, por el contrario en los tratamientos C y D fue inferior entre 24,7 y 1,6 % respectivamente, no hallándose diferencias significativas.

Con respecto a los medios suplementados con metolacloro, se desarrollaron entre 11,3 y 23,2% más esclerocios que en el control en los tratamientos A y B, mientras que en los C y D se obtuvieron entre 41,2 y 74,4% menos esclerocios que en aquel, siendo estos últimos significativamente diferentes. Se observó un claro efecto inhibitorio a medida que aumentó la concentración de metolacloro.

En todos los tratamientos con trifluralina y acetoclor se produjeron más esclerocios que en el control, sin embargo solo se observaron diferencias significativas en los tratamientos A de trifluralina y B de acetoclor, que lo superaron en 48,8 y 53,1% respectivamente.

En el experimento con imazetapir hubo mayor producción de esclerocios en el tratamiento A, superando al control en 16%; mientras que en los tratamientos B, C y D fueron inferiores en 11,5; 53,9 y 19,7% respectivamente, encontrándose diferencias significativas solo en el C.

Con respecto a los medios de cultivo suplementados con la mezcla de imazetapir+acetoclor no se evidenciaron diferencias significativas, en ellos las diferencias con el control oscilaron entre -3,1 y 1,2% (tablas 15 y 16, fig. 12).

### Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)

El peso promedio de esclerocios producidos por caja de Petri en cada medio suplementado con los herbicidas usados en cultivo de maní, constan en las tablas 17 y 18.

**Tabla 17.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

Herbicidas (ml/l)	Producción de esclerocios (g/caja de Petri)				
	Control	A - 0,01	B - 0,025	C - 0,05	D - 0,1
Acetoclor	0,1534	0,161	0,1623	0,1635	0,1558
Imazetapir	0,1533	0,1356	0,1667	0,175	0,1751
Metolacoloro	0,194	0,1873	0,2126	0,1889	0,208
Trifluralina	0,16	0,151	0,153	0,159	0,148
Pendimetalín	0,175	0,1827	0,1867	0,2116	0,19

Nota: Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 18.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con mezcla de herbicidas.

Herbicidas (ml/l)	Producción de esclerocios (g/caja de Petri)		
	Control	Mezcla 1-0,025/0,025	Mezcla 2-0,025/0,037
Imazetapir+ Acetoclor	0,1867	0,2018	0,1951

Nota: Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

No se comprobaron diferencias significativas entre el peso total promedio de los esclerocios producidos en cada medio suplementado con herbicidas y el control.

### Viabilidad de esclerocios

La viabilidad de los esclerocios de *S. minor* producidos en cada medio suplementado con los herbicidas usados en el cultivo de maní constan en las tablas 19 y 20.

**Tabla 19.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

Herbicidas (ml/l)	Viabilidad (%)				
	Control	A - 0,01	B - 0,025	C - 0,05	D - 0,1
Acetoclor	95,1	95,9	90,1	97,2	95,4
Imazetapir	100	97,5	96	98	98,8
Metolacoloro	100	100	95,1	100	96,3
Trifluralina	97,2	95,5	98,1	100	91,9
Pendimetalín	100	100	100	100	100

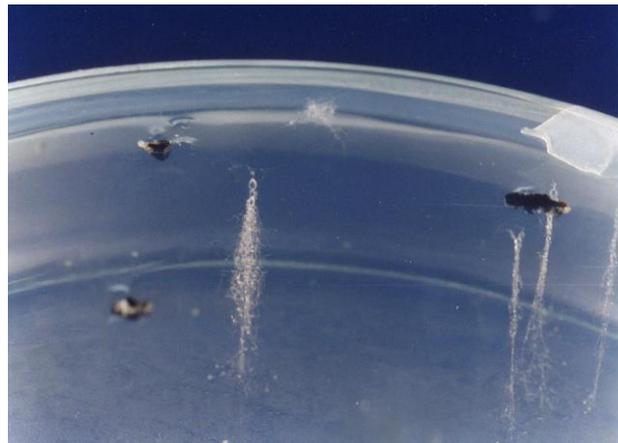
Nota: Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 20.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con mezcla de herbicidas.

Herbicidas (ml/l)	Viabilidad (%)		
	Control	Mezcla 1-0,025/0,025	Mezcla 2-0,025/0,037
Imazetapir+ Acetoclor	100	100	100

Nota: Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

No hubo diferencias significativas en la viabilidad de los esclerocios. La viabilidad de los esclerocios osciló entre 90,1 y 100%. Los esclerocios producidos en los medios suplementados con imazetapir + acetoclor y pendimetalín en todas sus concentraciones, en los tratamientos A y C con metolacloro y C con trifluralina y en el control de imazetapir germinaron en el 100%. Por el contrario el menor porcentaje de esclerocios viables (90,1%) se observó en el tratamiento B con acetoclor. En los restantes tratamientos los valores de viabilidad fueron intermedios a estos (tablas 19 y 20).

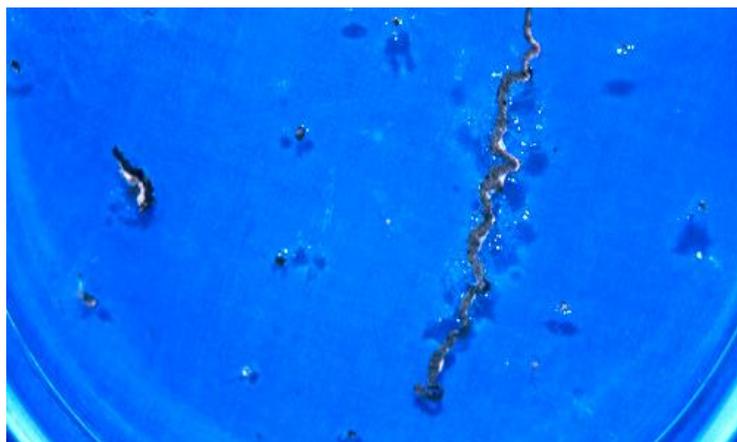


**Fig. 13:** Germinación de esclerocios de *S. minor* sembrados en agar-agua.

El micelio desarrollado a partir de los esclerocios sembrados sobre agar-agua en todos los tratamientos, formó colonias de contorno irregular, con largas hifas que pendieron hacia la tapa de la caja por haber sido cultivados en posición invertida (fig. 13).

### Colonias en cultivo

En los medios suplementados con metolacloro las colonias repitieron el modelo de crecimiento del control, pero en las concentraciones C y D los esclerocios coalescieron alcanzando hasta 0,7 mm de diámetro. Se desarrollaron



muy pocos esclerocios de tamaño normal (entre 0,1-0,15 cm de

**Fig. 14:** Esclerocios de *S. minor* obtenidos en el tratamiento D con pendimetalín.

diámetro). En los tratamientos con imazetapir no hubo una distribución de esclerocios típica de *S. minor* sobre APG. En los tratamientos A, B y C tendieron a formarse cerca del borde de la caja de Petri pero de dimensiones normales de esta especie, sin embargo

en el tratamientos D coalescieron entre sí originando esclerocios alargados que formaban círculos concéntricos sobrecolonias que no alcanzaron el borde de la caja de Petri.

Con respecto a los medios con pendimetalín en los tratamientos C y D el micelio tampoco se desarrolló hasta el borde de la caja, formándose un anillo esclerocial en el contorno de la colonia. Este evento fue más notable en el tratamiento D donde se observaron esclerocios de hasta 4 cm de largo (fig. 14).

En los tratamientos A, B y C con acetoclor las colonias se comportaron de manera similar al control, mientras que en el D se originó un anillo central de 3 cm de diámetro además de los esclerocios típicos de la especie en la periferia.

Con respecto a la mezcla de herbicidas, en el tratamiento 1 los esclerocios se distribuyeron de manera uniforme sobre el medio y en el 2 hubo formación de un anillo esclerocial de bordes irregulares cerca del límite de la caja de Petri.

En los medios suplementados con trifluralina el micelio se desarrolló siguiendo un patrón de crecimiento similar al del control (Lámina 1.1-2).

*Sclerotium rolfsii***Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)**

Los esclerocios producidos en los medios suplementados con herbicidas se encuentran registrados en las tablas 21 y 22, graficándose en la fig. 15 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 21.** Número de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

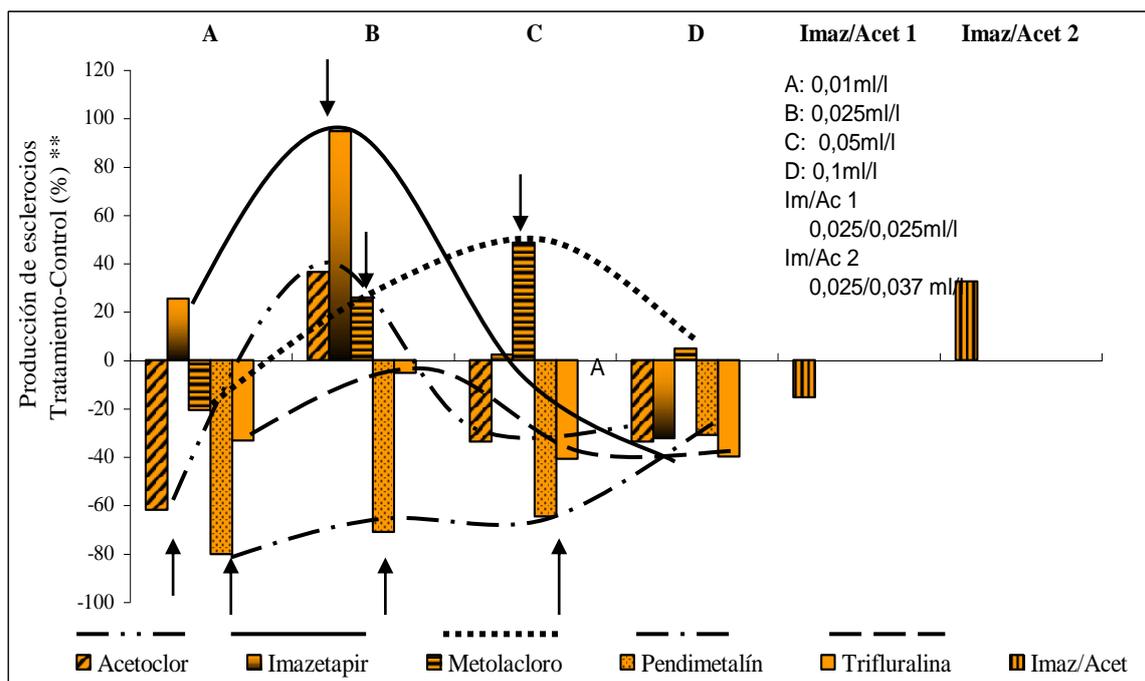
Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Herbicidas (ml/l)	Co Control	A - 0,01	A-Co (%)	B - 0,025	B-Co (%)	C - 0,05	C-Co (%)	D - 0,1	D-Co (%)
Acetoclor	225	85	<u>-62</u>	307	36,4	149	<u>-33,7</u>	149	<u>-33,7</u>
Imazetapir	225	282	25,3	438	<u>94,6</u>	230	2,2	152	-32,4
Metolacoloro	225	178	-20,8	283	<u>25,7</u>	334	<u>48,4</u>	236	4,8
Trifluralina	225	150	-33,3	213	-5,3	133	<u>-40,8</u>	135	-40
Pendimetalín	225	44	<u>-80,4</u>	65	<u>-71,1</u>	79	<u>-64,8</u>	155	<u>-31,1</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 22.** Número de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con mezcla de herbicidas.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)					
Herbicidas (ml/l)	Control	Mezcla 1 0,025/0,025	1-Co (%)	Mezcla 2 0,025/0,0375	2-Co (%)
Imazetapir/Acetoclor	225	190	-15,5	298	32,4

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 15.** Producción (Nº/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. rolfsii* en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas respecto al control.

La producción de esclerocios fue superior al control en los tratamientos A, B y C de los medios suplementados con imazetapir, habiéndolo superado en un 94,6% en el tratamiento B, el cual resultó significativamente diferente. Por el contrario en el tratamiento D fue inferior en un 32,4%, no habiendo una diferencia significativa. Con metolacloro ninguno de los tratamientos resultó significativamente diferente, sin embargo se produjo un incremento del número de esclerocios en relación al aumento de la concentración de herbicida en los tratamientos A, B y C, variando entre -20,8% y 48,4 %. En el tratamiento D si bien se formaron más esclerocios que en el control, disminuyó a un 4,8%.

En los medios suplementados con pendimetalín se produjeron menos esclerocios que en control en todos los tratamientos, hallándose diferencias significativas en los A, B y C, siendo inferior al control en -80,4; -71,1; -64,8% respectivamente. Se observó que la producción de esclerocios aumentaba a medida que se incrementaba la concentración del herbicida, alcanzando -31,1% en el tratamiento.

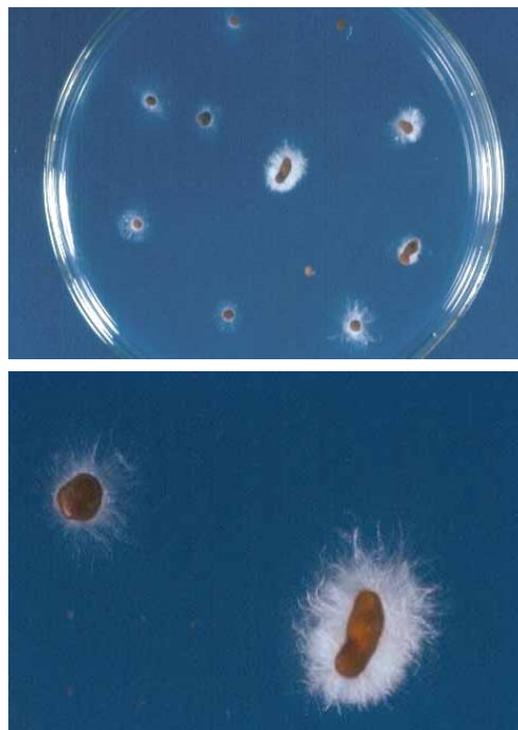
En los tratamientos con acetoclor solo hubo diferencia significativa en el tratamiento A con -62 % de esclerocios producidos. En los C y D resultaron de -33,7 y -33,7% respectivamente, mientras que en el tratamiento B fue superior en un 36,4%.

Con respecto a los medios suplementados con trifluralina y pendimetalín no se encontraron diferencias significativas, siendo la producción de esclerocios al control en todos los tratamientos.

En los tratamientos con los herbicidas imazetapir/acetoclor no se encontraron diferencias significativas. No obstante se obtuvo menor número de esclerocios en la mezcla 1 (-15,5 %) y mayor en la 2 (32,4 %) (tablas 21 y 22, fig. 15).

### Viabilidad de esclerocios

La viabilidad de los esclerocios de *S. rolfsii* producidos en cada medio suplementado con los herbicidas usados en el cultivo de maní constan en la tabla 23 y 24 y fig. 16.



**Fig. 16:** Germinación de esclerocios de *S. rolfsii* sembrados sobre agar-agua.

**Tabla 23.** Viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

Herbicidas (ml/l)	Viabilidad (%)				
	Control	A - 0,01	B - 0,025	C - 0,05	D - 0,1
Acetoclor		40,27	62,47	37,48	83,26
Imazetapir		74,96	95,8	65,61	70,8
Metolacoloro	79,15	43,05	56,24	76,03	59,7
Trifluralina		29,13	62,47	59,35	51,38
Pendimetalín		<u>8,3</u>	<u>27,76</u>	<u>27,73</u>	<u>14,58</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 24.** Viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con mezcla de herbicidas.

Herbicidas (ml/l)	Viabilidad (%)		
	Control	Mezcla 1-0,025/0,025	Mezcla 2-0,025/0,037
<b>Imazetapir+</b> <b>Acetoclor</b>	79,15	72,87	77,77

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos. No obstante en el tratamiento B con imazetapir y D con acetoclor hubo más esclerocios viables que en el control, mientras que con los otros herbicidas y restantes tratamientos de estos se obtuvo menor viabilidad respecto de aquel (tablas 23 y 24).

En todos los tratamientos con pendimetalín se encontró significativamente menos esclerocios viables que en el control.

### Colonias en cultivo

Las colonias de *S. rolfsii* tomaron consistencia algodonosa en los tratamientos D con todos los herbicidas y en los tratamientos A, B y C con acetoclor, trifluralina y pendimetalín, a diferencia del control que típicamente desarrolla micelio aplanado sobre APG. Esta particular consistencia algodonosa aumentaba con la concentración de los herbicidas.

Del mismo tipo resultó la colonia desarrollada en el tratamiento A con metolacoloro y con ambas mezclas de herbicidas. No así en el control y los restantes tratamientos.

Los esclerocios de los tratamientos C con metolacoloro, B con imazetapir y B con acetoclor se formaron aglomeraciones, pero estos conservaban el tamaño de los esclerocios del control (Lámina 2.1-2).

*Trichoderma* sp.**Producción de conidios (ufc/caja de Petri)**

Los conidios producidos por caja de Petri en los medios suplementados con herbicidas usados en el cultivo de maní, constan en las tablas 25 y 26, graficándose en la fig. 17 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 25.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

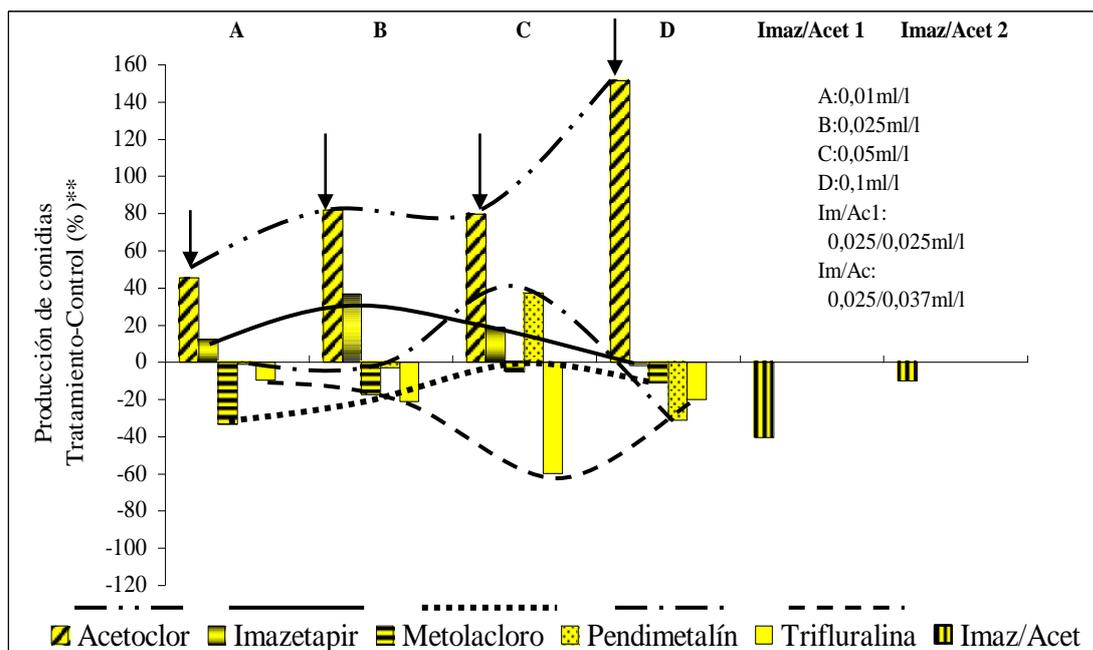
Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja)									
Herbicida (ml/l)	Co Control	A-0,01	A-Co (%)	B-0,025	B-Co (%)	C-0,05	C-Co (%)	D-0,1	D-Co (%)
Acetoclor	2,49	3,62	<u>45,3</u>	4,53	<u>81,9</u>	4,47	<u>79,5</u>	6,26	<u>151,4</u>
Imazetapir	3,06	3,44	12,4	4,18	36,6	3,63	18,6	3	-1,9
Metolacoloro	2,93	1,95	-33,4	2,42	-17,4	2,78	-5,1	2,6	-11,2
Trifluralina	3,57	3,23	-9,5	2,82	-21	1,43	-59,9	2,85	-20,1
Pendimetalín	2,93	2,9	-1	2,85	-2,7	4,02	37,2	2,01	-31,3

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 26.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con mezcla de herbicidas.

Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja)					
Herbicida (ml/l)	Control	Mezcla 1 0,025/0,025	1-Co (%)	Mezcla 2 0,025/0,0375	2-Co (%)
Imazetapir/Acetoclor	6,77	4,04	-40,3	6,09	-10,4

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 17.** Producción (Nº/caja de Petri) relativa de conidios de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas respecto al control.

En los medios suplementados con acetoclor hubo un incremento paulatino del número de conidios a medida que aumentó la concentración del herbicida, superaron al control en todas las concentraciones evaluadas desde un 45,3% en el tratamiento A hasta un 151% correspondiente al tratamiento D encontrándose diferencias significativas en este último.

No se hallaron diferencias significativas en las evaluaciones con trifluralina. El número de conidios resultó inferior al control en todos los tratamientos, obteniéndose una disminución de 9,5; 21; -59,9 y 20,1 % para los tratamientos A, B, C y D respectivamente.

En los medios suplementados con metolacloro e imazetapir+acetoclor no se hallaron diferencias significativas, obteniéndose una disminución de la producción de conidios de 33,4; 17,4; 5,1 y 11,2 % para A, B, C y D de metolacloro y 40,3 y 10,4 % para imazetapir+acetoclor.

Con imazetapir no se encontraron diferencias significativas, sin embargo en los tratamientos A, B y C produjeron más conidios que en el control, y en el D resultó levemente inferior.

Tampoco se hallaron diferencias significativas en los tratamientos con pendimetalín, solo el C superó al control en un 37,1 % en los restantes fueron inferiores (tablas 25 y 26, fig. 17).

### **Colonias de en cultivo**

Se observaron escasas diferencias entre las colonias de los distintos tratamientos. Tanto su patrón de crecimiento como la producción de conidios no difirieron en gran medida con el control (Lámina 3.1-2).

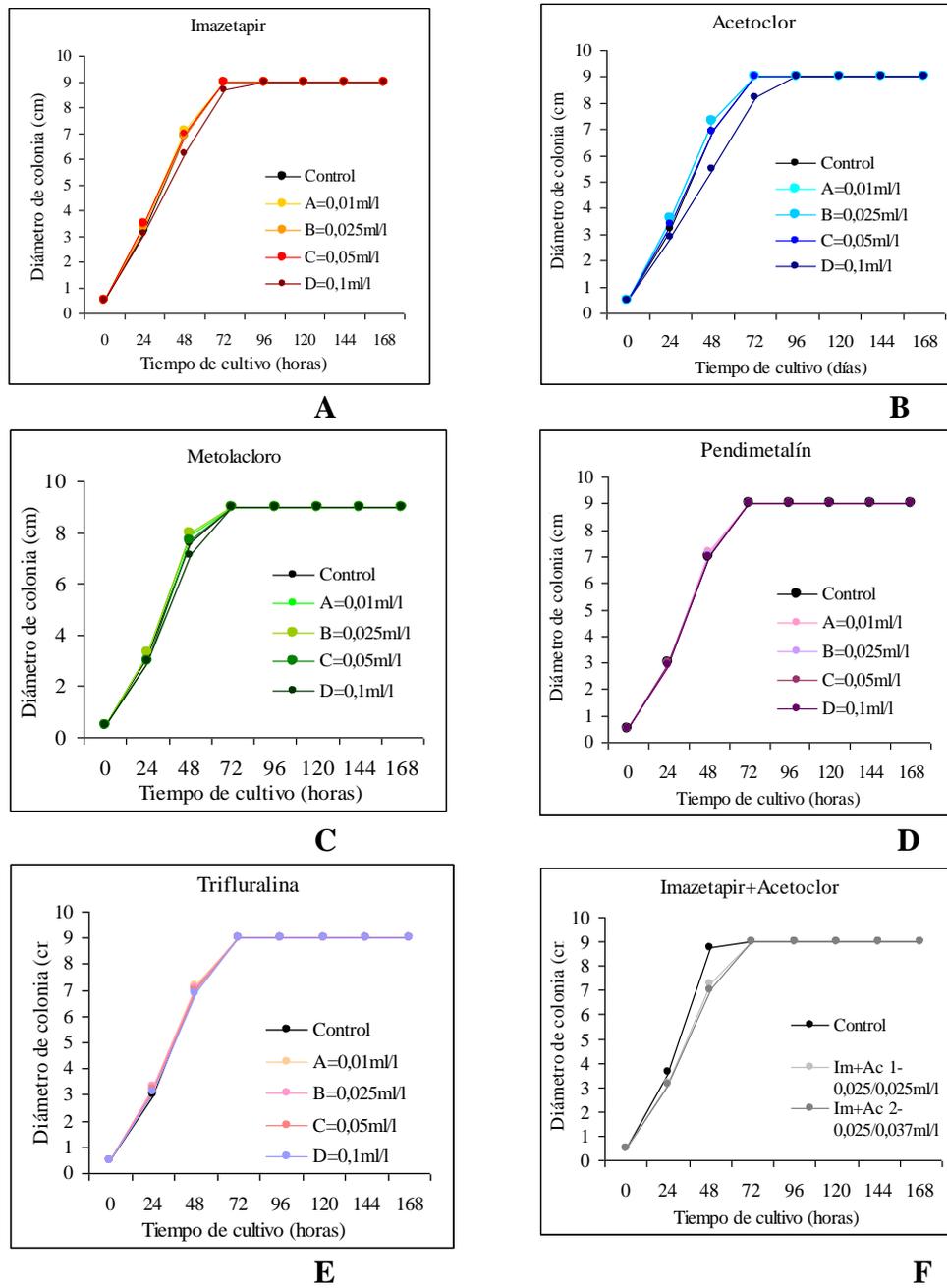
### **Crecimiento lineal (cm/h)**

El crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado sobre medios de cultivo suplementados con herbicidas constan en la tabla 27, y las curvas con estos construídas se encuentran graficadas en la fig. 18.

**Tabla 27.** Crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

Herbicidas		Diámetro de colonia (cm/hora)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
<b>Acetoclor</b>	Control	0,5	3,2	6,9	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3,6	7,3	9	9	9	9	9
	B-0,025	0,5	3,6	7,3	9	9	9	9	9
	<b>C-0,05</b>	<b>0,5</b>	<b>3,4</b>	<b>6,9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	D-0,1	0,5	2,9	5,5	8,2	9	9	9	9
<b>Trifluralina</b>	Control	0,5	3,04	7,1	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3,3	7,2	9	9	9	9	9
	B-0,025	0,5	3,3	7,1	9	9	9	9	9
	<b>C-0,05</b>	<b>0,5</b>	<b>3,2</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	D-0,1	0,5	3,1	6,9	9	9	9	9	9
<b>Metolacoloro</b>	Control	0,5	3,2	7,6	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3,3	7,9	9	9	9	9	9
	B-0,025	0,5	3,3	8	9	9	9	9	9
	<b>C-0,05</b>	<b>0,5</b>	<b>3</b>	<b>7,7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	D-0,1	0,5	3	7,1	9	9	9	9	9
<b>Pendimetalín</b>	Control	0,5	3	7	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3	7,2	9	9	9	9	9
	B-0,025	0,5	3	7,1	9	9	9	9	9
	<b>C-0,05</b>	<b>0,5</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	D-0,1	0,5	2,9	7	9	9	9	9	9
<b>Imazetapir</b>	Control	0,5	3,2	6,9	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3,5	7,1	9	9	9	9	9
	<b>B-0,025</b>	<b>0,5</b>	<b>3,3</b>	<b>6,9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	<b>C-0,05</b>	<b>0,5</b>	<b>3,5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	D-0,1	0,5	3,1	6,2	8,7	9	9	9	9
<b>Imazetapir + Acetoclor</b>	Control	0,5	3,62	8,75	9	9	9	9	9
	<b>Mezcla 1 0,025/0,025</b>	<b>0,5</b>	<b>3,2</b>	<b>7,27</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	<b>Mezcla 2 0,025/0,037</b>	<b>0,5</b>	<b>3,15</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>

**Nota:** Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.



**Fig. 18.** Crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio de cultivo APG suplementado con herbicidas.

De acuerdo a lo observado en la figura 20, la velocidad de avance de la colonia desarrollada en los medios con los herbicidas probados, representada por el diámetro promedio por día, fue similar. Aún habiéndose observado un retraso en el crecimiento de las colonias desarrolladas en el tratamiento D con acetoclor y en los dos tratamientos con mezcla de herbicidas, el análisis realizado mediante la comparación de las tasas de incremento evidenció que no hubo diferencias significativas (tabla 27, fig. 18).

## **CAPITULO IV**

# **RESULTADOS: Fertilizantes nitrogenados**

---

## CAPITULO IV

### RESULTADOS: Fertilizantes nitrogenados

#### *Sclerotinia minor*

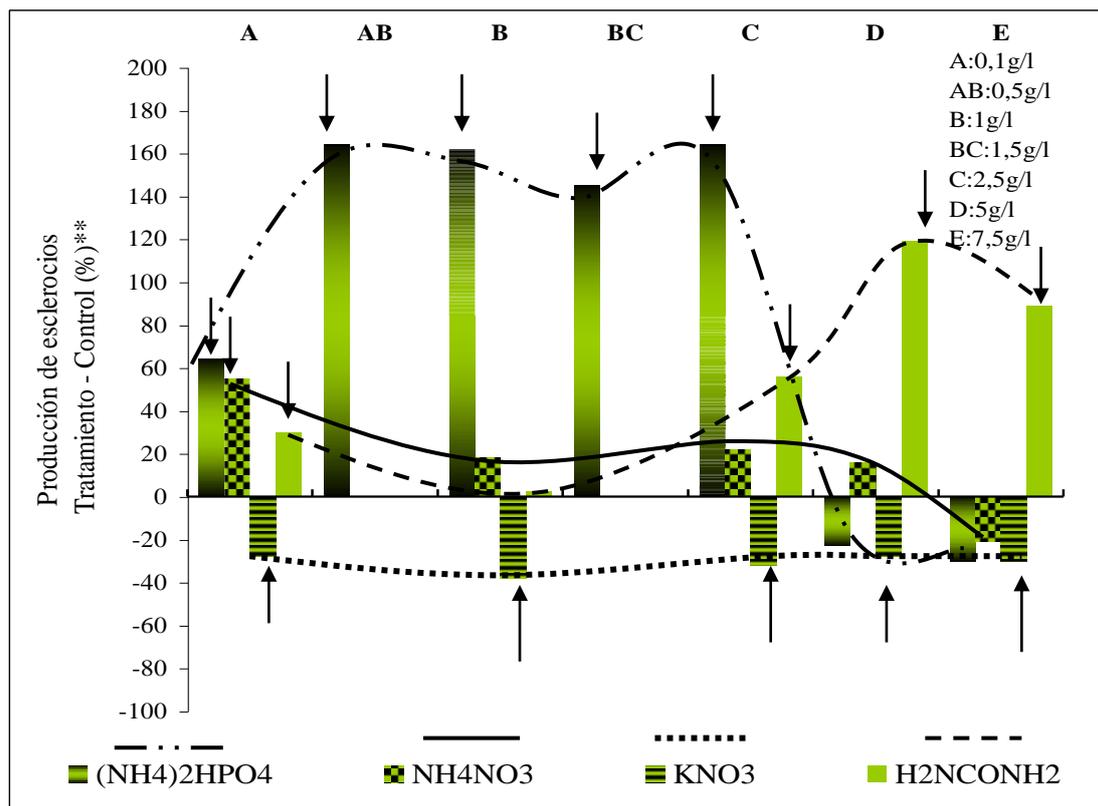
#### Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)

El número de esclerocios de *S. minor* producidos por caja de Petri en medio de cultivo APG suplementado con los fertilizantes nitrogenados usados en el cultivo de maíz constan en la tabla 28, graficándose en la fig. 19 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 28.** Número de esclerocios de *S. minor* desarrollado en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)															
Fertilizantes (g/l)	Co Control	A-0,1	A-Co (%)	AB-0,5	AB-Co (%)	B-1,0	B-Co (%)	BC-1,5	BC-Co (%)	C-2,5	C-Co (%)	D-5,0	D-Co (%)	E-7,5	E-Co (%)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	669	1097	<u>64</u>	1767	<u>164</u>	1757	<u>162</u>	1645	<u>145</u>	1770	<u>164</u>	515	-23	466	-30
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	391	606	<u>55</u>			463	18			479	22	454	16	310	-21
KNO <sub>3</sub>	428	307	<u>-28</u>			267	<u>-38</u>			290	<u>-32</u>	307	<u>-28</u>	300	<u>-30</u>
H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	360	468	<u>30</u>			370	3			562	<u>56</u>	787	<u>119</u>	682	<u>89</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y los destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 19.** Producción (N°/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. minor* en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados respecto al control

Las evaluaciones en los medios suplementados con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> indicaron que en los tratamientos A, B, C y D hubo mayor producción de esclerocios que en el control, siendo significativa solo en el tratamiento A (55%).

En todos los medios de cultivo suplementados con H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub> se desarrollaron más esclerocios que en el control, observándose en general un aumento de su producción a medida que se incrementaba la concentración del fertilizante. El número de esclerocios producidos en los tratamientos A, C, D y E superaron significativamente al control en 30, 56, 119 y 89% respectivamente; mientras que en el tratamiento B no se evidenciaron diferencias significativas.

Con respecto al (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, en una primera experiencia se observó que el número de esclerocios producidos en los tratamientos A, B y C superaba ampliamente al control. Con el objetivo de aumentar la precisión del experimento, se probaron concentraciones intermedias entre los tratamientos A, B y C, las denominadas AB y BC.

Los esclerocios producidos superaron al control con diferencias significativas en los tratamientos A, AB, B, BC y C, con valores entre 64 y 164%, por el contrario en los D y E fueron inferiores y no hubo diferencias significativas.

En todos los medios de cultivo suplementados con  $\text{KNO}_3$  la producción de esclerocios fue significativamente inferior al control, variando entre  $-28$  y  $-38$  % (tabla 28, fig. 19).

### Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)

El peso promedio de los esclerocios producidos por caja de Petri en los distintos tratamientos con fertilizantes nitrogenados se registran en la tabla 29.

**Tabla 29.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)								
Fertilizantes	Co Control	A 0,1g/l	AB 0,5g/l	B 1,0g/l	BC 1,5g/l	C 2,5g/l	D 5,0g/l	E 7,5g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,1771	0,1728	0,2058	0,2057	0,168	0,2025	0,1885	0,1763
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,1795	<u>0,2181</u>		0,1726		0,1765	0,1815	0,163
$\text{KNO}_3$	0,1908	0,2029		<u>0,232</u>		0,2323	0,1768	0,185
$\text{H}_2\text{NCONH}_2$	0,1789	<u>0,2167</u>		0,19		0,1793	0,1868	0,1814

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y los destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.

Los fertilizantes nitrogenados  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , indujeron una producción significativa de esclerocios solamente en el tratamiento A.

En los medios suplementados con  $\text{KNO}_3$  el peso total de los esclerocios por caja fue superior al control en los tratamientos A, B y C, siendo el solo el B significativamente diferente.

Con respecto al  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, no obstante los resultados indicaron que, excepto en el tratamiento A, BC y E, hubo una mayor producción de más masa esclerocial en todos ellos (tabla 29).

### Viabilidad de esclerocios

En la tabla 30 se halla registrado el porcentaje de esclerocios viables en los distintos tratamientos de los fertilizantes.

**Tabla 30.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Fertilizantes	Viabilidad (%)							
	Co	A	AB	B	BC	C	D	E
	Control	0,1g/l	0,5g/l	1,0g/l	1,5g/l	2,5g/l	5,0g/l	7,5g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	97,6	97,4	97,4	100	100	97,4	97,2	100
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	99,4	100		100		100	100	100
$\text{KNO}_3$	99,3	100		100		100	97,9	97,9
$\text{H}_2\text{NCONH}_2$	100	100		95,8		100	100	100

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y los destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.

No se hallaron diferencias significativas respecto de la viabilidad de los esclerocios, la que osciló entre 95,8 y el 100%,.

### Colonias en cultivo

En general se observó que las colonias obtenidas sobre los medios suplementados con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ , produjeron esclerocios distribuidos sobre el medio de forma similar al control, excepto en el tratamiento E correspondiente a  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ , donde se unieron originando un anillo “festoneado” llegando al borde de la caja de Petri y otro en el centro de 2 cm de diámetro, distribución atípica de esclerocios de *S. minor* sobre APG.

Con respecto a los medios con  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en los tratamientos A, AB, B, BC y C los esclerocios no formaron anillos. En cambio los D y E los originaron de 2 y 1,5 cm de diámetro respectivamente (Lámina 4).

## *Sclerotium rolfii*

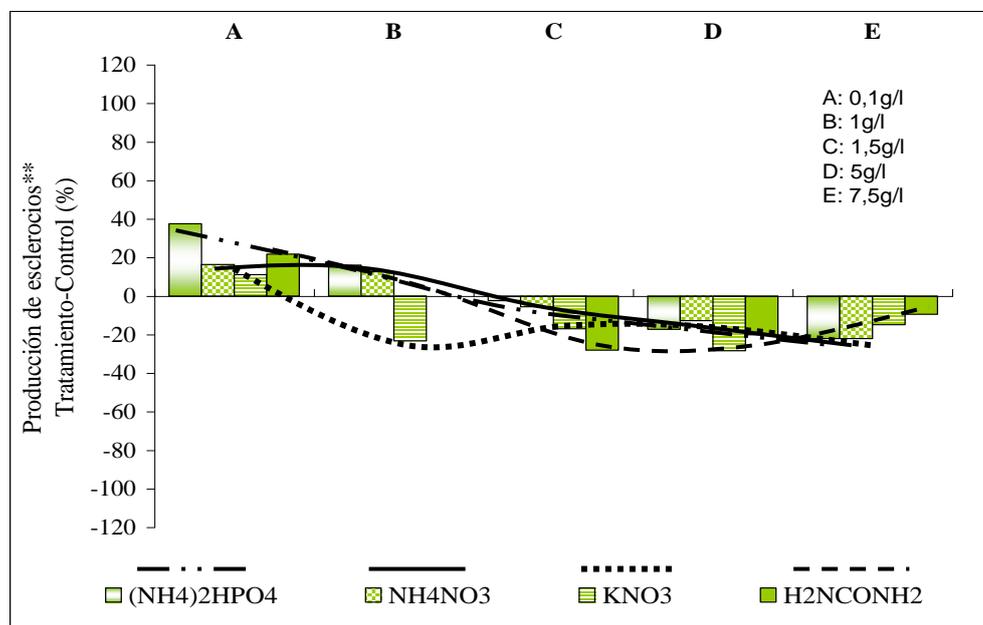
### Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)

Los esclerocios producidos en los medios suplementados con los fertilizantes nitrogenados usados en el cultivo de maíz constan en la tabla 31, graficándose en la fig. 20 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 31.** Número de esclerocios de *S. rolfii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)											
Fertilizantes	Co Control	A 0,1g/l	A-Co (%)	B 1g/l	B-Co (%)	C 2,5g/l	C-Co (%)	D 5g/l	D-Co (%)	E 7,5g/l	E-Co (%)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	47,4	65,17	37,4	55	16	46,2	-2,5	39,17	-17,3	36,83	-22,2
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	47,4	55,17	16,3	53,33	12,5	44,4	-5,6	41,33	-12,8	36,83	-22,2
$\text{KNO}_3$	69	76,67	11,1	52,8	-23,4	57,2	-17,1	49,4	-28,4	58,6	-15
$\text{H}_2\text{NCONH}_2$	69	54	21,7	69	0	49,5	-28,2	55	-20,2	58,6	-9,5

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 20.** Producción (N°/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. minor* en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados respecto al control.

Se observó que no hubo diferencias significativas en ninguno de las experiencias la producción de esclerocios disminuyó respecto del control a medida aumentaban las concentraciones de los fertilizantes, observándose que en los tratamientos C, D y E de todos ellos se hallaron menor cantidad de esclerocios que en el control.

Con respecto al  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  los tratamientos A y B superaron al control en un 27% y 14 % respectivamente, estos fueron los medios sobre los que se produjeron mayor número de esclerocios en los tratamientos con fertilizantes.

También superaron en formación de esclerocios al control los tratamientos A y B con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y A con  $\text{KNO}_3$  (tabla 31, fig. 20).

### Viabilidad de esclerocios

Los resultados obtenidos en el análisis de viabilidad constan en la tabla 32.

**Tabla 32.** Viabilidad de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Fertilizantes	Control	Viabilidad (%)				
		A	B	C	D	E
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		128	140	128	123	133
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	130	143	153	140	130	15
$\text{KNO}_3$		158	164	120	120	11
$\text{H}_2\text{NCONH}_2$		125	155	153	130	110

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

No se hallaron diferencias significativas respecto a la viabilidad de los esclerocios, el 100 % de estos resultaron viables. Además hubo formación de esclerocios *de novo* tanto en los tratamientos como en el control, es decir que se recolectaron más esclerocios que los sembrados (tabla 32),.

### Colonias en cultivo

Las colonias se desarrollaron sin evidenciar notables diferencias con el control en todos los tratamientos, excepto en los C, D y E de los medios suplementados con  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$  cuyos esclerocios resultaron de mayor tamaño respecto del control (Lámina 5).

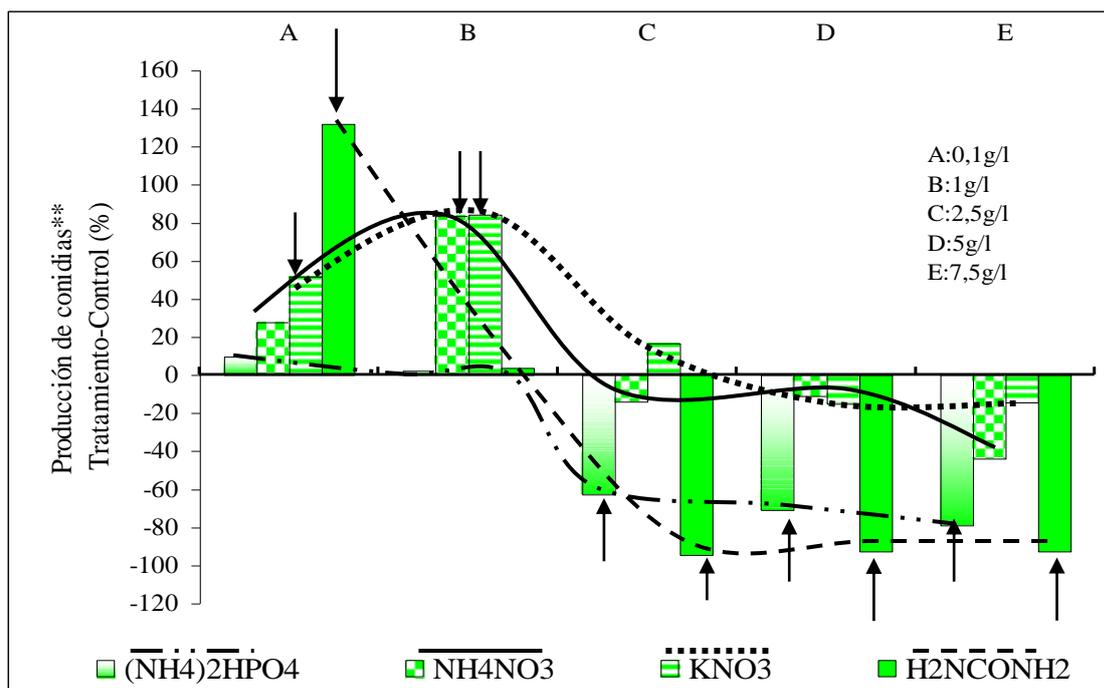
*Trichoderma* sp.**Producción de conidios (ufc/caja de Petri)**

Las conidios producidos por caja de Petri en los medios suplementados con fertilizantes nitrogenados constan en la tabla 33, graficándose en la fig. 21 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 33.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja de Petri)											
Fertilizante	Co Control	A 0,1g/l	A-Co (%)	B 1g/l	B-Co (%)	C 2,5g/l	C-Co (%)	D 5g/l	D-Co (%)	E 7,5g/l	E-Co (%)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,05	4,44	9,6	4,14	2,2	1,51	<u>-62,7</u>	1,18	<u>-70,8</u>	8,46	<u>-79</u>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,31	5,51	27,84	7,91	<u>83,5</u>	3,71	-13,9	3,84	-10,9	2,42	-43,8
KNO <sub>3</sub>	4,05	6,15	<u>51,8</u>	7,47	<u>84,8</u>	4,73	16,8	3,44	-15,1	3,47	-14,3
H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	4,31	10	<u>132</u>	4,48	3,9	0,23	<u>-94,6</u>	0,32	<u>-92,6</u>	0,3	<u>-92,8</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni para un nivel de significación de 0,05

**Fig. 21.** Producción (Nº/caja de Petri) relativa de conidios de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados respecto al control.

Se observó que en las experiencias con H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub> la producción de conidios fue significativamente superior al control en el tratamiento A, superándolo en 132 %; sin embargo en B se produjeron 3,9 % más que en aquel y en C, D y E fue inferior con – 94,6; -92,6 y -92,8 % respectivamente.

En los medios suplementados con KNO<sub>3</sub> hubo mayor cantidad de conidios que en control en los tratamientos A, B y C, (27,84; 83,5 y 16,8 % respectivamente). En cambio en los D y E fue inferior, -15,1 y -14,3 %; hallándose diferencias significativas en A y B solamente.

En los tratamientos con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> el número de conidios superó al control en 9,6 y 2,2 % en los tratamientos A y B mientras que en los C, D y E fueron inferiores con -62,7; -70,8 y -79 %. Solo se hallaron diferencias significativas en estos tres últimos (tabla 33, fig. 21).

**Colonias en cultivo**

Las colonias mostraron un color verde más intenso en las producidas sobre medios con  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , siendo más pálidas en los medios suplementados con  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$

La coloración de las colonias se halla ligado al número de conidios originados en estas, a mayor intensidad de color mayor número de conidios.

Además las colonias obtenidas en los tratamientos con  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ , resultaron de color amarillento-marrón, coincidiendo también con el color de los conidios al microscopio (Lámina 6).

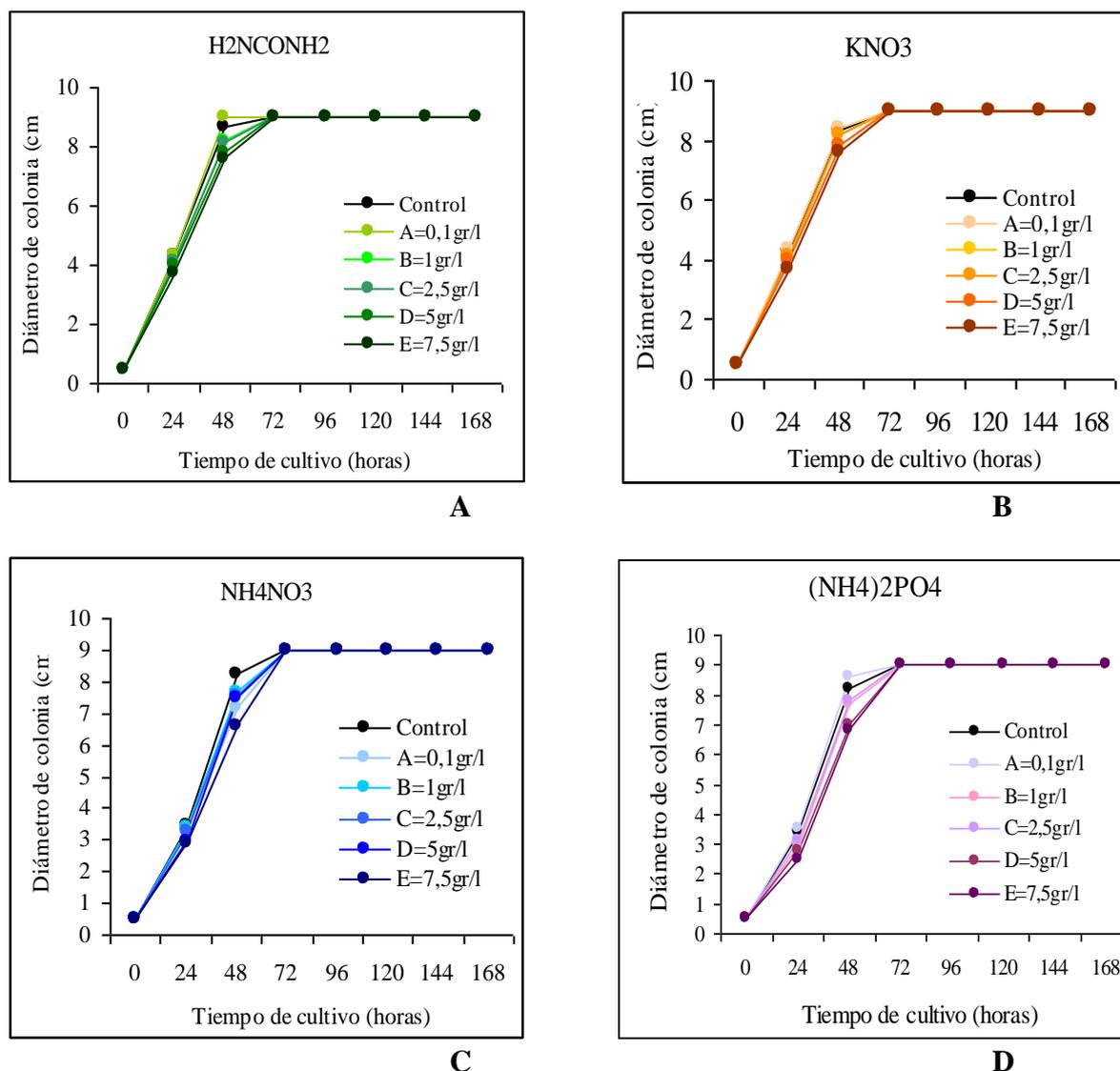
**Crecimiento lineal (cm/h)**

El crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio de cultivo suplementado con fertilizantes nitrogenados constan en la tabla 34 y en la fig. 22.

**Tabla 34.** Crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

Fertilizante (gr/l)	Diámetro de colonia (cm)								
	Control	Tiempo de cultivo (horas)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Control	0,5	3,43	8,23	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3,5	8,6	9	9	9	9	9
	B-1	0,5	2,92	7,7	9	9	9	9	9
	C-2,5	0,5	3,15	7,78	9	9	9	9	9
	D-5	0,5	2,77	6,99	9	9	9	9	9
	<b>E-7,5</b>	<b>0,5</b>	<b>2,5</b>	<b>6,8</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	Control	0,5	3,5	8,2	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	3,3	7,2	9	9	9	9	9
	B-1	0,5	3,4	7,7	9	9	9	9	9
	C-2,5	0,5	3,3	7,5	9	9	9	9	9
	D-5	<b>0,5</b>	<b>3</b>	<b>7,5</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	<b>E-7,5</b>	0,5	2,8	6,6	9	9	9	9	9
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Control	0,5	4,31	8,3	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	4,33	8,4	9	9	9	9	9
	B-1	0,5	4,04	8,18	9	9	9	9	9
	C-2,5	0,5	4,14	8,17	9	9	9	9	9
	D-5	0,5	3,97	7,79	9	9	9	9	9
	<b>E-7,5</b>	<b>0,5</b>	<b>3,73</b>	<b>7,59</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub></b>	Control	0,5	4,31	8,65	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	4,33	8,4	9	9	9	9	9
	B-1	0,5	4,04	8,17	9	9	9	9	9
	C-2,5	0,5	4,14	8,16	9	9	9	9	9
	D-5	0,5	<b>3,97</b>	<b>7,79</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
	<b>E-7,5</b>	<b>0,5</b>	9,72	7,59	9	9	9	9	9

**Nota:** Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.



**Fig. 22.** Crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio de cultivo APG suplementado con fertilizantes nitrogenados.

El análisis de comparación de tasas de incremento de las curvas indicó que no hubo diferencia significativa en ninguno de los tratamientos. Sin embargo se observaron diferencias en los diámetros de colonia a las 48 h de cultivo, la que aumentaba en relación a la concentración de fertilizante (tabla 34, fig. 22).

## **CAPITULO IV - Anexo**

# **RESULTADOS: Asimilación de nitrógeno**

---

## CAPITULO IV Anexo

### RESULTADOS: Asimilación de nitrógeno

#### *Sclerotinia minor*

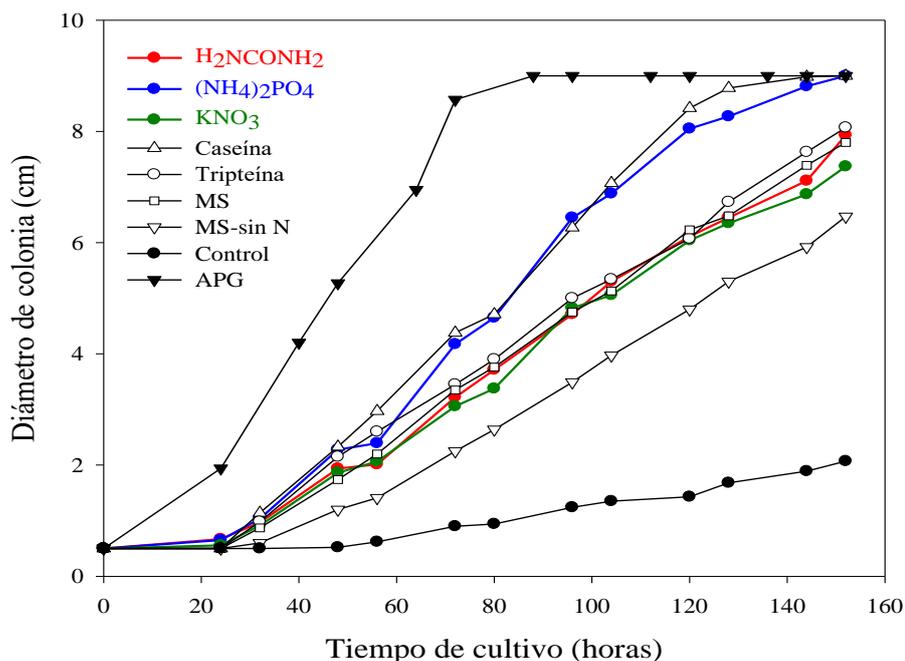
#### Crecimiento lineal (cm/h)

El crecimiento de *S. minor* desarrollado en medio de cultivo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno se encuentra registrado en la tabla 35 y graficados en la fig. 23.

**Tabla 35.** Crecimiento de *S. minor* desarrollado en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno

Medio	Diámetro de colonia (cm/h)																	
	0	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144	152
<b>Control<sup>1</sup></b>	0,5	0,5	0,5		0,52	0,62		0,9	0,94		1,24	1,35		1,43	1,68		1,8	2,07
<b>H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub></b>	0,5	0,67	0,97		1,94	2,01		3,22	3,71		4,71	5,3		6,11	6,45		7,1	7,93
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,5	0,65	1,04		2,28	2,39		4,18	4,65		6,45	6,88		8,05	8,27		8,8	9
<b>KNO<sub>3</sub></b>	0,5	0,56	0,91		1,86	2,06		3,06	3,38		4,83	5,06		6,04	6,35		6,8	7,37
<b>MS</b>	0,5	0,5	0,87		1,74	2,2		3,35	3,76		4,75	5,13		6,23	6,48		7,3	7,8
<b>MS sin N</b>	0,5	0,5	0,6		1,2	1,41		2,25	2,64		3,49	3,97		4,8	5,3		5,9	6,47
<b>Caseína</b>	0,5	0,5	1,14		2,33	2,97		4,38	4,71		6,27	7,07		8,42	8,78		8,9	9
<b>Tripteína</b>	0,5	0,5	0,98		2,15	2,6		3,45	3,9		5	5,34		6,07	6,73		7,6	8,07
<b>APG</b>	0,5	1,94		4,2	5,27		6,95	8,57		9	9		9	9		9	9	9

<sup>1</sup>: Agua destilada agarizada.



**Fig. 23.** Crecimiento de *S. minor* sp. desarrollado en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

A través de la comparación de las tasas de incremento respecto del control se comprobó que hubo diferencias significativas en todos los tratamientos.

Se observó también que la curva de  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  fue similar a la de caseína, y que las de  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$   $\text{KNO}_3$  a las de MS y tripteína, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos de tratamientos.

También se observó que hubo desarrollo de colonias en medio MS sin nitrógeno, superando significativamente al control, no obstante su crecimiento fue menor que en los restantes tratamientos testigos; Estas se diferenciaron significativamente de las colonias desarrolladas sobre APG y los suplementados con  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  y caseína. No hubo diferencias significativas con respecto a  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ,  $\text{KNO}_3$ , MS y tripteína (tabla 35, fig. 23).

### **Biomasa (gr/caja de Petri)**

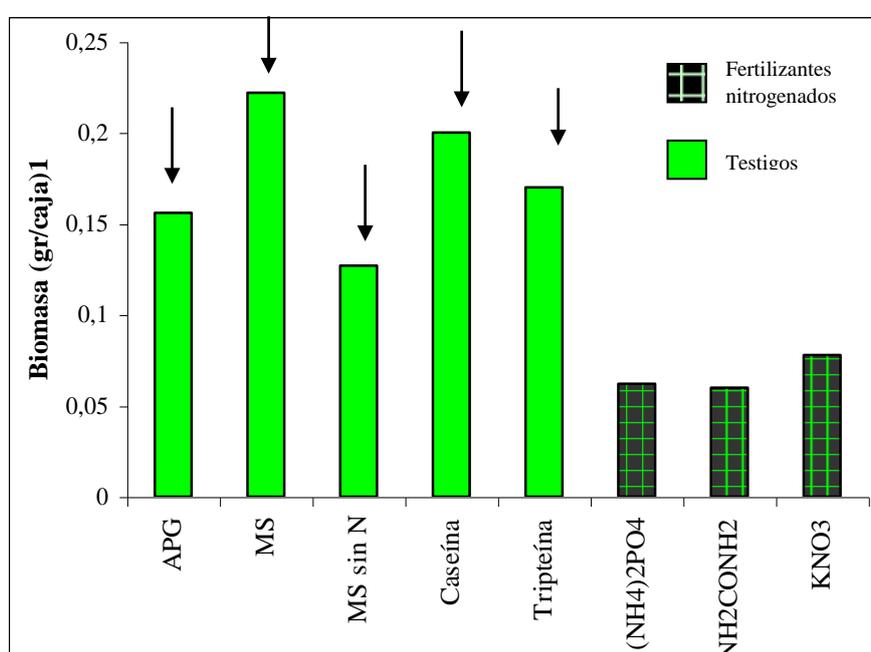
La biomasa de *S. minor* obtenida sobre MS sin N con distintas fuentes de nitrógeno consta en la tabla 36 y se encuentran graficados en la fig. 24.

**Tabla 36.** Biomasa de *S. minor* obtenida sobre medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

Medios de cultivo	Control <sup>1</sup> (Co)	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> -Co	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Co	KNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub> -Co	MS	MS-Co	MS sin N	MS sin N-Co	Caseína	Caseína-Co	Tripteína	Tripteína-Co	APG	APG-Co
Biomasa (gr/caja Petri)	0,15	0,21	0,06	0,21	0,06	0,23	<u>0,07</u>	0,37	<u>0,22</u>	0,28	<u>0,12</u>	0,35	<u>0,2</u>	0,32	<u>0,17</u>	0,31	<u>0,15</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

<sup>1</sup>: Agua destilada agarizada.



<sup>1</sup>: Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

Los medios evaluados, excepto APG, están constituidos por MS sin N más la fuente de nitrógeno correspondiente.

**Fig. 24.** Producción (N°/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. minor* sp. en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno respecto al control.

La mayor biomasa fue obtenida en el medio suplementado con las sales de MS pesando 0,22 gr/caja de Petri. Le siguieron en orden descendente las correspondientes a caseína, tripteína, APG y MS s/N con 0,2; 0,17; 0,15 y 0,12 gr/caja de Petri, los que se diferenciaron significativamente del control .

Las obtenidas en los medios con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub> y KNO<sub>3</sub> no se diferenciaron del control. Cabe destacar que hubo formación de esclerocios solo en los

tratamientos con  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ,  $\text{KNO}_3$ , MS, y MS s/N; sin embargo eran mucho más pequeños que los obtenidos sobre APG. Algunos fueron de poca consistencia y otros no alcanzaron a desarrollarse completamente, quedando como manchas marrones sobre el papel celofán. Estas últimas características fueron más notables en los tratamientos con tripteína y caseína (tabla 36, fig. 24) (Lámina 7).

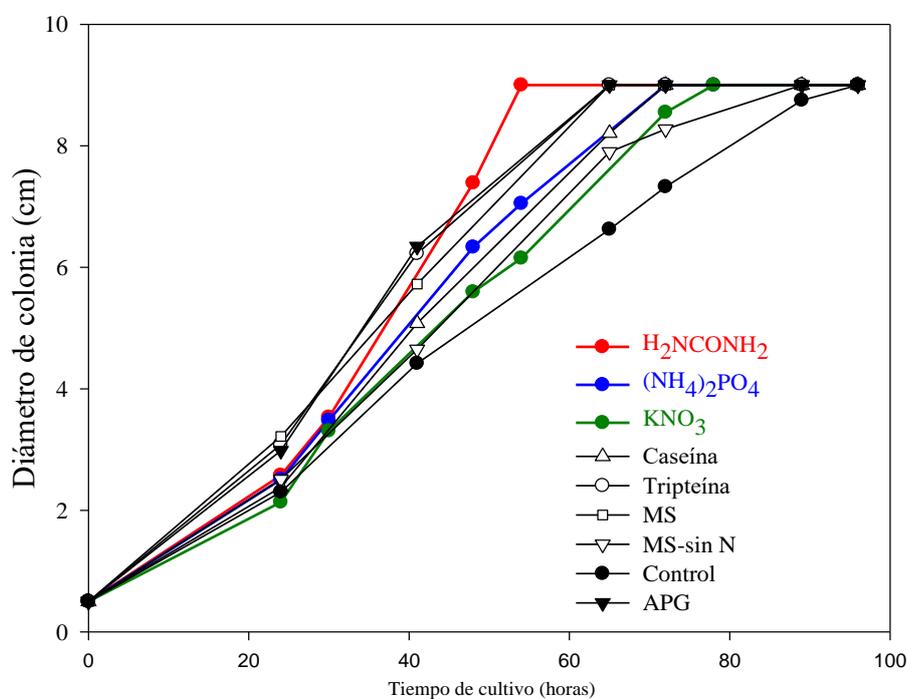
*Sclerotium rolfii***Crecimiento lineal (cm/h)**

El crecimiento de *S. rolfii* desarrollado en medio MS sin N suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno consta en la tabla 37<sub>a</sub> y en la fig. 25.

**Tabla 37.** Crecimiento de *S. rolfii* desarrollado en medio de cultivo suplementado con distintas fuentes de nitrógeno

Medios	Diámetro de colonia (cm/h)										
	0	24	30	41	48	54	65	72	78	89	96
Control <sup>1</sup>	0,5	2,34		4,41	-		9	9		9	9
H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0,5	2,6	3,53		6,49	7,39		9	9		9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	2,51	3,48		6,33	7,05		9	9		9
KNO <sub>3</sub>	0,5	2,14	3,31		5,59	6,15		8,55	9		9
MS	0,5	3,22		5,73	-		9	9		9	9
MS sin N	0,5	2,51		4,65	-		7,9	8,28		9	9
Caseína	0,5	2,38		5,08	-		8,21	8,67		9	9
Tripteína	0,5	3,1		6,23	-		9	9		9	9
APG	0,5	2,98		6,34	-		9	9		9	9

<sup>1</sup>: Agua destilada agarizada.



**Fig. 25.** Crecimiento de *S. rolfii* sp. desarrollada en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

Se observó que las colonias obtenidas en el medio suplementado con  $H_2NCONH_2$  alcanzaron el borde de la caja de Petri a las 54 h de cultivo mientras que en  $(NH_4)_2PO_4$  y  $KNO_3$  lo alcanzaron a las 72 y 78 h de cultivo respectivamente. Realizando el análisis comparativo de sus tasas de incremento se encontró que no hubo diferencias significativas entre estas (tabla 37, fig. 25).

Las mediciones correspondientes a las 48 h de los medios MS, MS sin N, caseína, tripteína, APG y el control no fueron registradas.

### Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)

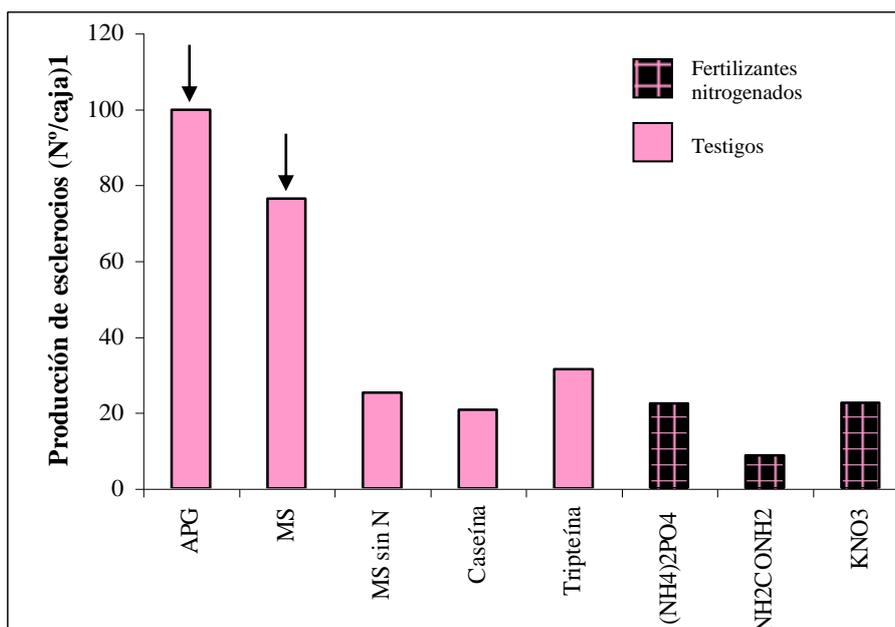
Los esclerocios de *S. rolf sii* producidos sobre medios suplementados con distintas fuentes de nitrógeno constan en la tabla 38 y en la fig. 26.

**Tabla 38.** Producción de esclerocios de *S. rolf sii* obtenidos sobre MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno

Medios de cultivo	Control (Co)	$H_2NCONH_2$	$H_2NCONH_2$ -Co (%)	$(NH_4)_2PO_4$	$(NH_4)_2PO_4$ -Co (%)	$KNO_3$	$KNO_3$ -Co (%)	MS sin N	MS sin N-Co (%)	MS	MS-Co (%)	Caseína	Caseína-Co (%)	Tripteína	Tripteína-Co (%)	APG	APG-Co (%)
Esclerocios (Nº/caja de Petri)	6,3	14,7	8,4	28,4	22,1	28,5	22,5	31,3	25,3	82,3	<u>76,3</u>	26,7	20,7	37,5	31,5	105,8	<u>99,8</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

<sup>1</sup>: Agua destilada agarizada.



<sup>1</sup>: Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

Los medios evaluados, excepto APG, están constituídos por MS sin N más la fuente de nitrógeno correspondiente.

**Fig. 26.** Producción (N°/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. rolfsii* sp. en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno respecto al control.

Se observó una diferencia significativa en la producción de esclerocios en los medios APG y MS con 99,8 y 76,3 esclerocios respectivamente. En los restantes tratamientos, si bien se formaron más esclerocios que en el control, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 38, fig. 26) (Lámina 8).

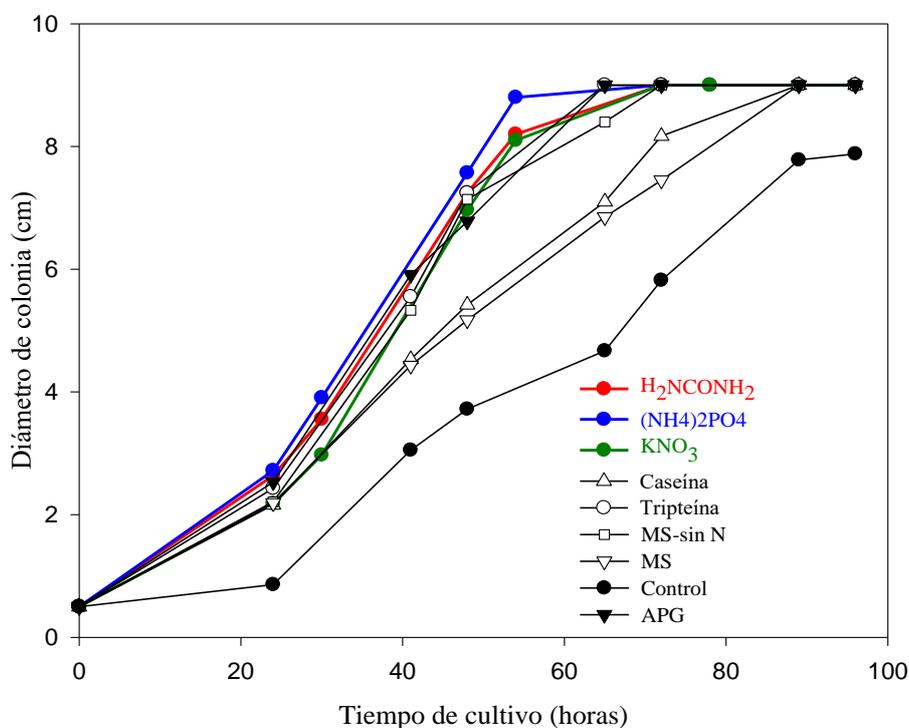
*Trichoderma sp.***Crecimiento lineal (cm/h)**

El crecimiento de *Trichoderma sp.* desarrollado en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno constan en la tabla 39 y en la fig. 27.

**Tabla 39.** Crecimiento de *Trichoderma sp.* obtenido en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

Medio	Diámetro de colonia (cm/h)										
	0	24	30	41	48	54	65	72	78	89	96
Control <sup>1</sup>	0,5	0,86		3,05	3,73		4,68	5,83		7,78	7,88
H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0,5	2,64	3,56		7,24	8,21		9	9		9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	2,72	3,91		7,57	8,8		9	9		9
KNO <sub>3</sub>	0,5	2,18	2,97		6,96	8,1		9	9		9
MS	0,5	2,19		4,43	5,16		6,85	7,45		9	9
MS sin N	0,5	2,21		5,33	7,14		8,4	9		9	9
Caseína	0,5	2,14		4,53	5,42		7,1	8,17		9	9
Tripteína	0,5	2,43		5,55	7,24		9	9		9	9
APG	0,5	2,53		6,78	9		9	9		9	9

<sup>1</sup>: Agua destilada agarizada.



**Fig. 27.** Crecimiento de *Trichoderma sp.* desarrollado en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

A través de la comparación de las tasas de incremento se determinó que no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control.

Sin embargo hubo una aparente diferencia en las colonias desarrolladas sobre los medios con caseína y MS los que alcanzaron el borde a las 89 h de cultivo mientras que en el control fue a las 96 hs, y en los restantes tratamientos entre las 65 y 72 h de cultivo (tabla 39, fig. 27).

### Producción de conidios (Nº/caja de Petri)

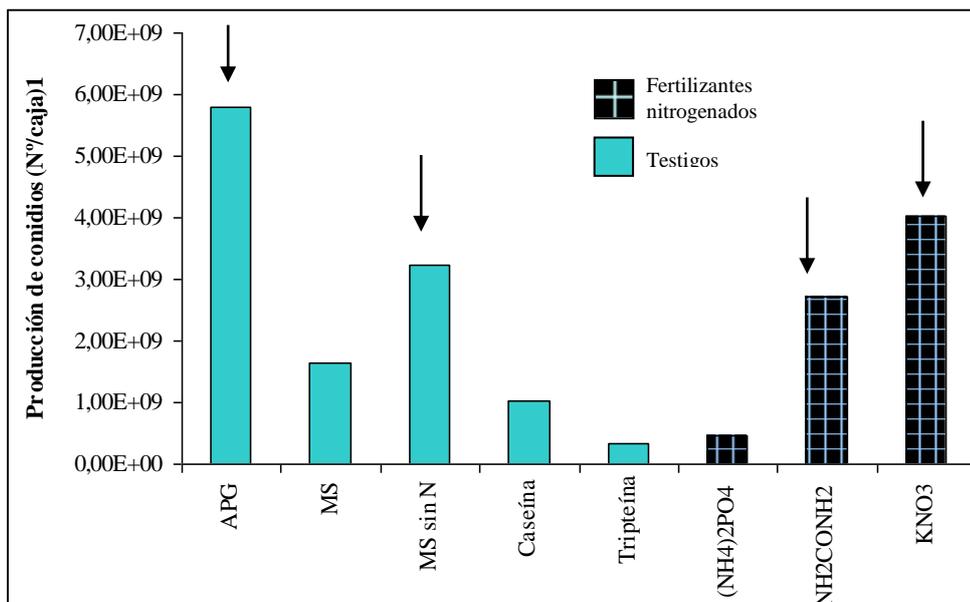
Los conidios de *Trichoderma* sp. producidos sobre MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno se encuentran registrados en la tabla 40, habiéndose graficado los datos correspondientes en la fig. 28

**Tabla 40.** Producción de conidios de *Trichoderma* sp. obtenida sobre MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno.

Medios de cultivo	Control <sup>1</sup> (Co)	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> -Co	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Co	KNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub> -Co	MS	MS-Co	MS sin N	MS sin N- Co	Caseína	Caseína-Co	Tripteína	Tripteína- Co	APG	APG-Co
Conidios (Nº x10 <sup>9</sup> /caja de Petri)	0,069	2,8	<u>2,79</u>	0,54	0,53	4,1	<u>4,09</u>	1,7	1,69	3,3	<u>3,2</u>	1,1	1,09	0,41	0,4	5,9	<u>5,89</u>

Nota: Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

<sup>1</sup>: Agua destilada agarizada.



<sup>1</sup>: Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

Los medios evaluados, excepto APG, están constituidos por MS sin N más la fuente de nitrógeno correspondiente.

**Fig. 28.** Producción (Nº/caja de Petri) relativa de conidios de *Trichoderma* sp. en medio MS sin N suplementado con distintas fuentes de nitrógeno respecto al control.

Se observó una mayor producción de conidios mostrando diferencias significativas en el medio APG con  $5,89 \times 10^9$  conidios por caja de Petri. También hubo diferencias significativas en los obtenidos en KNO<sub>3</sub>, MS sin N y H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub> con  $4,09$ ;  $3,2$  y  $2,79 \times 10^9$  conidios respectivamente. En los restantes tratamientos no se observaron diferencias significativas (tabla 40, fig. 28) (Lámina 9).

**CAPITULO V**

**RESULTADOS:  
Fungicidas**

---

## CAPITULO V

### RESULTADOS: Fungicidas

#### *Sclerotinia minor*

#### Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)

El número promedio de esclerocios producidos por caja de Petri en cada medio suplementado con los fungicidas usados en maní para el control de la viruela, consta en las tablas 41, 42, 43 y 44, graficándose en la fig. 29 la diferencia porcentual entre los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 41.** Número de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con tebuconazole.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicida	Co Control	A - 0,01	A-Co (%)	B - 0,02	B-Co (%)	C - 0,03	C-Co (%)	D 0,04ml/l	D-Co (%)
Tebuconazole	441	25,1	-94,1	90	-79,5	0	-100	0	-100

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 42.** Número de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con difenoconazole.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control	A - 0,5	A-Co (%)	B - 1,0	B-Co (%)	C - 2,0	C-CO (%)	D - 3,0	D-Co (%)
Difenoconazole	370	178	-51,8	415	12,1	440	18,9	523	41,3

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 43.** Número de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con flusilazole.

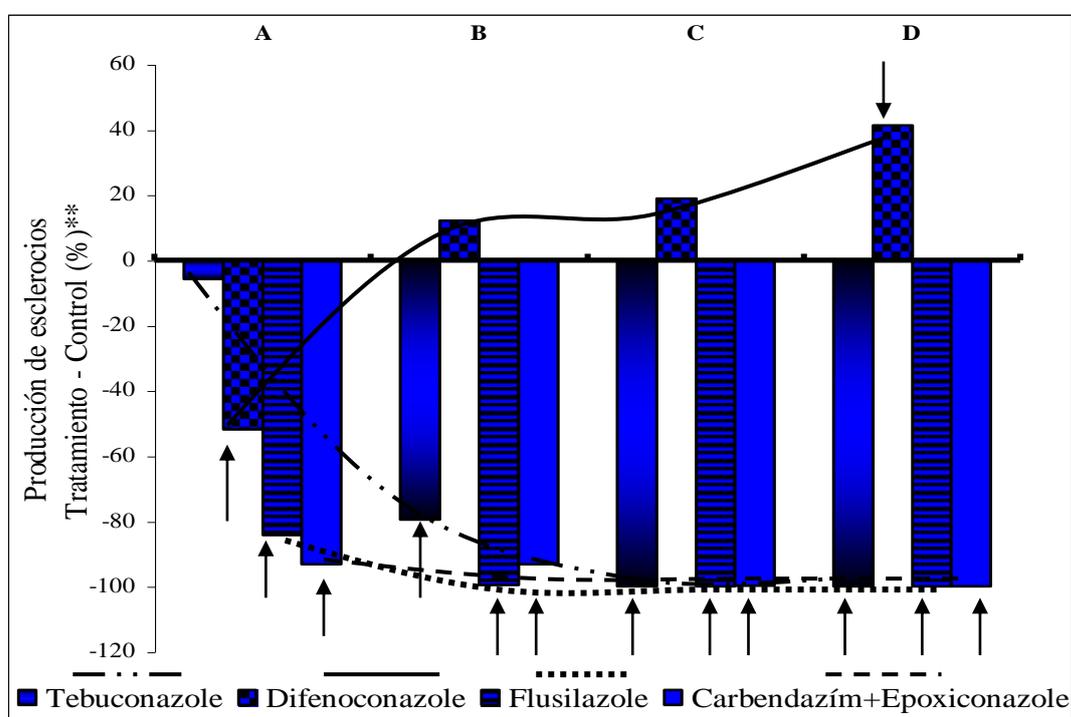
Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control	A - 0,002	A-Co (%)	B - 0,004	B-Co (%)	C - 0,006	C-Co (%)	D - 0,008	D-Co (%)
Flusilazole	616	96,7	-84,3	3	-99,5	0	-100	0	-100

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 44.** Número de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con carbendazím+epoxiconazole.

Producción de esclerocios (Nº/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control I	A - 0,01	A-Co (%)	B - 0,02	B-Co (%)	C - 0,03	C-Co (%)	D - 0,04	D-Co (%)
Carbendazím+epoxiconazole	638	44	<u>-93,1</u>	43	<u>-93,2</u>	1,5	<u>-99,7</u>	0	<u>-100</u>

Nota: Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



Fungicida (ml/l)	Referencias				
	Control	A	B	C	D
Tebuconazole	0	0,01	0,02	0,03	0,04
Difenoconazole	0	0,5	1	2	3
Flusilazole	0	0,002	0,004	0,006	0,008
Carbendazím+epoxiconazole	0	0,01	0,02	0,03	0,04

\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 29.** Producción (Nº/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. minor* en medio de cultivo APG suplementado con fungicidas respecto al control.

Se observó que la producción de esclerocios en todos los medios con carbendazím+epoxiconazole, flusilazole y tebuconazole fueron inferiores al control con diferencias significativas. Además en los tratamientos D de los tres fungicidas y C y D con flusilazole y tebuconazole los esclerocios no se desarrollaron.

Con respecto a difenoconazole hubo mayor número de esclerocios que en el control en las concentraciones B, C y D y menor en la A, siendo significativamente diferentes los tratamientos A y D. Además se observó un incremento en la producción de esclerocios a medida que aumentaba la concentración de fungicida (tablas 41, 42, 43 y 44; fig. 29).

### Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)

El peso promedio de los esclerocios producidos por caja de Petri en los diferentes tratamientos con fungicidas se registran en las tablas 45, 46, 47 y 48.

**Tabla 45.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con tebuconazole.

Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)					
Fungicidas (ml/l)	Control	A - 0,01	B - 0,02	C - 0,03	D - 0,4
Tebuconazole	0,18	<u>0,011</u>	<u>0,007</u>	0	0

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 46.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con difenoconazole.

Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)					
Fungicidas (ml/l)	Control	A - 0,5	B - 1	C - 2	D - 3
Difenoconazole	0,180	<u>0,155</u>	<u>0,145</u>	<u>0,136</u>	<u>0,126</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 47.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con flusilazole.

Fungicidas (ml/l)	Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)				
	Control	A - 0,002	B -- 0,004	C - 0,006	D - 0,008
<b>Flusilazole</b>	0,169	<u>0,086</u>	<u>0,002</u>	<u>0</u>	<u>0</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 48.** Peso de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con carbendazím+epoxiconazole.

Fungicidas (ml/l)	Producción de esclerocios (gr/caja de Petri)				
	Control	A - 0,01	B - 0,02	C - 0,03	D - 0,4
<b>Carbendazím+ epoxiconazole</b>	0,1854	<u>0,0313</u>	<u>0,0152</u>	<u>0,0005</u>	<u>0</u>

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

El peso promedio de los esclerocios producidos por caja de Petri en medio suplementado con cada uno de los fungicidas fue inferior al control, encontrándose diferencias significativas en todos los tratamientos.

### Viabilidad de esclerocios

Los resultados de la prueba de viabilidad se encuentran registrados en las tablas 49, 50, 51 y 52.

**Tabla 49.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con tebuconazole.

Fungicidas (ml/l)	Esclerocios viables (%)				
	Control	A - 0,01	B - 0,02	C - 0,03	D - 0,4
<b>Tebuconazole</b>	100	100	100	--	--

**Nota:** Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.

**Tabla 50.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con difenoconazole.

Fungicidas (ml/l)	Esclerocios viables (%)				
	Control	A - 0,5	B - 1	C - 2	D - 3
Difenoconazole	100	97,9	95,8	97,6	100

Nota: Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.

**Tabla 51.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con flusilazole.

Fungicidas (ml/l)	Esclerocios viables (%)				
	Control	A - 0,002	B -- 0,004	C - 0,006	D - 0,008
Flusilazole	100	95,8	95,8	86,6	--

Nota: Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.

**Tabla 52.** Viabilidad de esclerocios de *S. minor* producidos en medio de cultivo APG suplementado con carbendazím+epoxiconazole

Fungicida (ml/l)	Esclerocios viables (%)				
	Control	A - 0,01	B - 0,02	C - 0,03	D - 0,4
Carbendazím+ epoxiconazole	95,2	98,8	100	100	--

Nota: Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.

Se observó que el número de los esclerocios viables en los distintos tratamientos osciló entre 86,6 %, correspondiente al tratamiento C con flusilazole, y el 100 % (tablas 49, 50, 51 y 52).

### Colonias en cultivo

Se observó que todos los fungicidas afectaron el desarrollo de las colonias en los respectivos tratamientos.

En los suplementados con difenoconazole, las colonias aumentaron la irregularidad de su contorno a medida que aumentó la concentración, llegando a producir una colonia de aspecto ramificado en el tratamiento D. Además los esclerocios

del tratamiento A se formaron en la zona de avance de la colonia sin alcanzar el borde de la caja de Petri. La forma alargada de aquellos, dispuestos perpendicularmente al borde de la colonia le otorgó aspecto de flor.

Por su parte con flusilazole, solo hubo formación de colonias en el tratamiento A, no alcanzando el borde la caja de Petri. Los esclerocios conservaron las características típicas de *S. minor* desarrollado en PDA. En los restantes tratamientos no hubo crecimiento más que sobre el disco de siembra.

En los medios suplementados con tebuconazole y carbendazím+epoxiconazole se desarrollaron colonias que no superaron los 2 cm de diámetro y de formas alargadas. En los restantes tratamientos no hubo crecimiento alguno (Lámina 10).

*Sclerotium rolfsii***Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)**

El número promedio de esclerocios producidos por caja de Petri en cada medio suplementado con los fungicidas usados en maní para el control de la viruela, consta en las tablas 53, 54, 55 y 56, graficándose en la fig. 30 la diferencia porcentual entre las medias de los tratamientos y el control correspondientes.

**Tabla 53.** Número de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con tebuconazole.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control	A-0,01	A-Co (%)	B-0,02	B-Co (%)	C-0,03	C-Co (%)	D-0,4	D-Co (%)
Tebuconazole	70	50	-28,5	3	-95,7	2	-97,1	1	-98,5

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 54.** Número de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con difenoconazole.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control	A-0,5	A-Co (%)	B-1,0	B-Co (%)	C-2,0	C-Co (%)	D-3,0	D-Co (%)
Difenoconazole	69	35	-49,2	2	-97,8	1	-98,5	0,33	-99,5

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 55.** Número de esclerocios de *S. rolfsii* producidos en medios de cultivo APG suplementados con flusilazole.

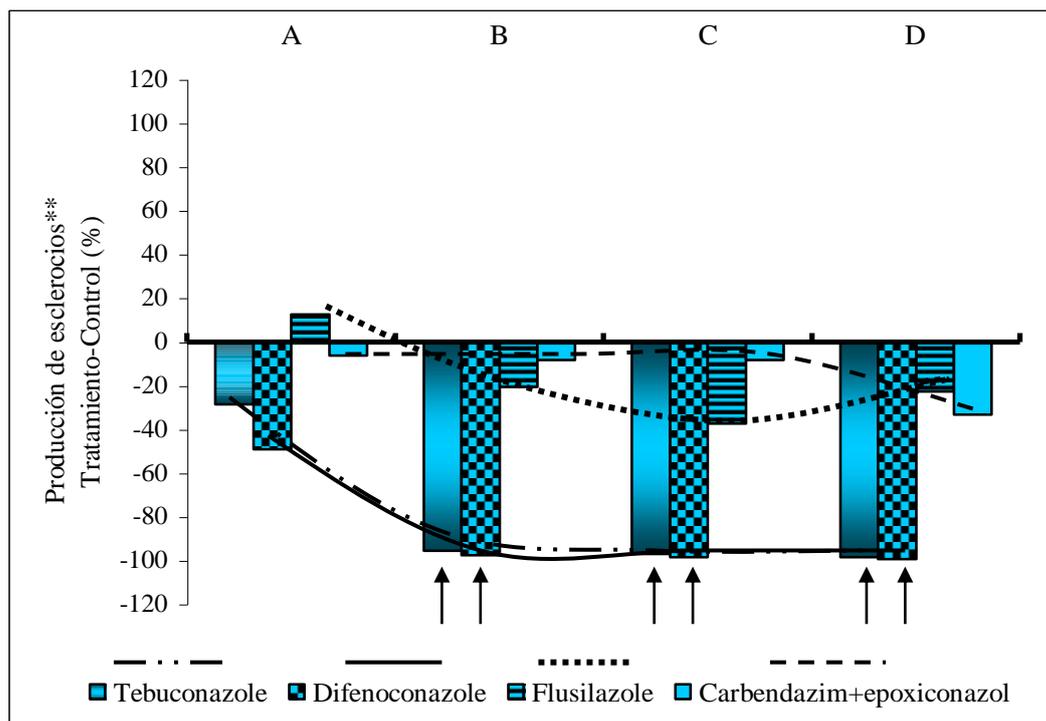
Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control	A-0,002	A-Co (%)	B-0,004	B-Co (%)	C-0,006	C-Co (%)	D-0,008	D-Co (%)
Flusilazole	48	54	12,5	38	-20,8	30	-37,5	37	-22,9

**Nota:** Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 56** Número de esclerocios de *S. rolf sii* producidos en medio de cultivo APG suplementado con carbendazím+epoxiconazole.

Producción de esclerocios (N°/caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Co Control	A -0,01	A-Co (%)	B -0,02	B-Co (%)	C -0,03	C-Co (%)	D -0,04	D-Co (%)
<b>Carbendazím+epoxiconazole</b>	48	45	-6,25	44	-8,3	44	-8,3	32	-33,3

Nota: Los datos destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



Referencias

Fungicida (ml/l)	Control	A	B	C	D
Tebuconazole	0	0,01	0,02	0,03	0,04
Difenoconazole	0	0,5	1	2	3
Flusilazole	0	0,002	0,004	0,006	0,008
Carbendazím+epoxiconazole	0	0,01	0,02	0,03	0,04

\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 30.** Producción (N°/caja de Petri) relativa de esclerocios de *S. rolf sii* en medio de cultivo APG suplementado con fungicidas respecto al control.

Se observó que solo hubo mayor producción de esclerocios que en el control en el tratamiento A de los medios suplementados con flusilazole, siendo menor en sus restantes tratamientos y los correspondientes a los demás fungicidas.

El análisis estadístico evidenció que había diferencias significativas en los tratamientos B, C y D con tebuconazole y difenoconazole, no habiéndose producido esclerocios en ninguno de estos. En los medios de cultivo suplementados con flusilazole y carbendazím+epoxiconazole no se encontraron diferencias significativas (tablas 52, 53, 54 y 55; fig. 30).

### **Viabilidad de esclerocios**

Los resultados de la prueba de viabilidad indicaron que hubo un 100% de viabilidad en todos los tratamientos.

### **Colonias en cultivo**

Se observó que en los tratamientos A con tebuconazole y difenoconazole hubo desarrollo de colonias con aspecto de rizomorfo, no encontrándose crecimiento en los restantes.

Un aspecto similar obtuvo el micelio de las colonias desarrolladas en los tratamientos A, B y C de los medios suplementados con carbendazím+epoxiconazole formando esclerocios que permanecieron blancos. En cambio en el tratamiento D la colonia se tornó compacta y detuvo su crecimiento antes de llegar al borde la caja de Petri.

Con respecto a los medios suplementados con flusilazole las colonias obtenidas produjeron micelio algodonoso en los tratamientos A y B, tornándose plano y compacto en los C y D. Sin embargo no hubo formación de esclerocios (Lámina 11).

*Trichoderma* sp.**Producción de conidios (N°/caja de Petri)**

Los conidios producidos por caja de Petri en los medios suplementados con fungicidas para control de viruela del maní constan en las tablas 57, 58, 59 y 60, graficándose en la fig. 31 las diferencias porcentuales entre las medias de los tratamientos y el control correspondiente.

**Tabla 57.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con tebuconazole.

Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja)									
Fungicida	Co	A	A-Co	B	B-Co	C	C-Co	D	D-Co
	Control	0,01m/l	(%)	0,02m/l	(%)	0,03m/l	(%)	0,4m/l	(%)
<b>Tebuconazole</b>	2,93	0,73	-75	0,49	-83,3	0,32	-89	0,3	-89,4

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 58.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con difenoconazole.

Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja)									
Fungicida	Control	A	A-Co	B	B-Co	C	C-Co	D	D-Co
		0,5m/l	(%)	1m/l	(%)	2m/l	(%)	3m/l	(%)
<b>Difenoconazole</b>	5,8	4,73	-18,4	4,22	-27,2	1,08	-81,4	3,32	-42,7

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 59.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con flusilazole.

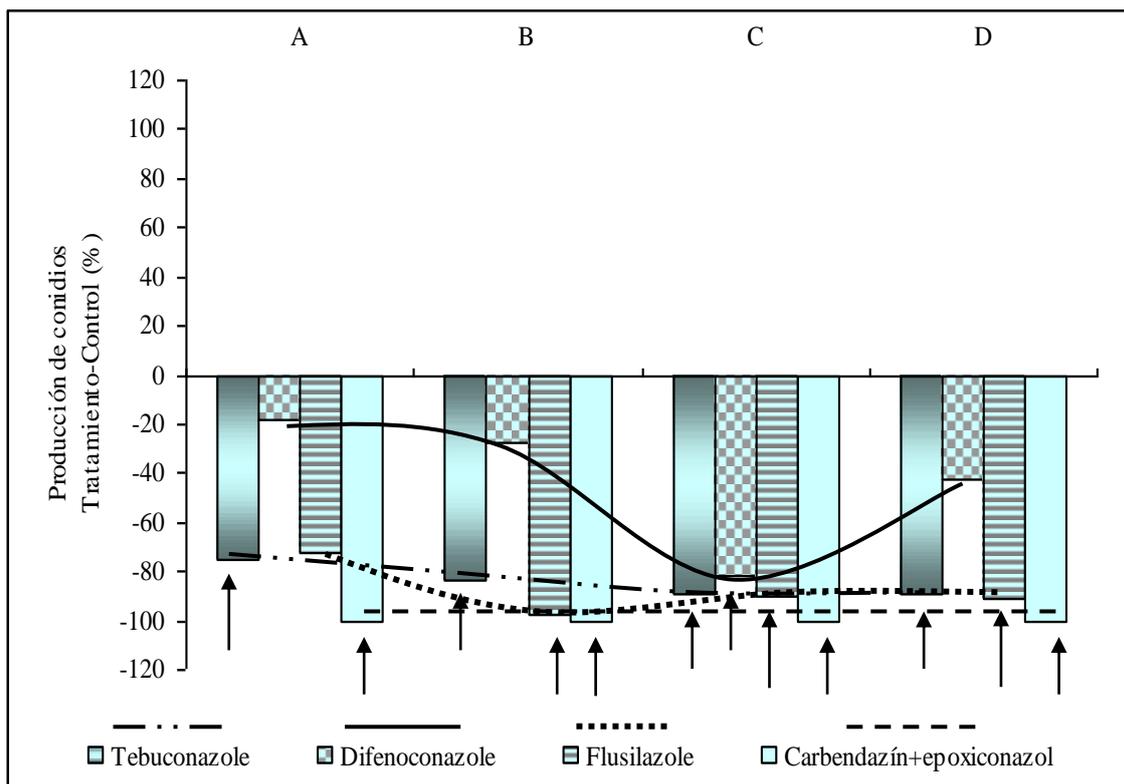
Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja)									
Fungicida	Co	A	A-Co	B	B-Co	C	C-Co	D	D-Co
	Control	0,002m/l	(%)	0,004m/l	(%)	0,006m/l	(%)	0,008m/l	(%)
<b>Fluzilazole</b>	4,01	1,09	-72,8	0,009	-97,7	0,41	-89,8	0,37	-90,8

**Nota:** Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.

**Tabla 60.** Número de conidios de *Trichoderma* sp. producidos en medio de cultivo APG suplementado con carbendazím+epoxiconazole.

Producción de conidios (ufcx10 <sup>9</sup> /caja de Petri)									
Fungicidas (ml/l)	Control	A -0,01	A-Co (%)	B-0,02	B-Co (%)	C-0,03	C-Co (%)	D-0,04	D-Co (%)
Carbendazím+epoxiconazole	4,01	0	<u>-100</u>	0	<u>-100</u>	0	<u>-100</u>	0	<u>-100</u>

Nota: Los datos subrayados son significativamente diferentes al control según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05 y destacados en rojo son los correspondientes a las dosis de campo.



Fungicidas (ml/l)	Referencias				
	Control	A	B	C	D
Tebuconazole	0	0,01	0,02	0,03	0,04
Difenoconazole	0	0,5	1	2	3
Flusilazole	0	0,002	0,004	0,006	0,008
Carbendazím+Epoxiconazole	0	0,01	0,02	0,03	0,04

\*\* : Las flechas señalan los tratamientos en los que hubo diferencias significativas según el test de Bonferroni a un nivel de significación de 0,05.

**Fig. 31.** Producción (N°/caja de Petri) relativa de conidios de *Trichoderma* sp. En medio de cultivo APG suplementado con fungicidas respecto al control.

Los resultados observados en las indicaron que se obtuvieron menos conidios respecto del control en todas las evaluaciones con fungicidas; encontrándose además

que en los medios suplementados con carbendazím+epoxiconazole no hubo desarrollo de ellas en ninguno de los tratamientos.

Se hallaron diferencias significativas con el control en los tratamientos B, C y D de los medios suplementados con flusilazole, habiéndose obtenido -97,7; -89,8 y -90,8 % respectivamente; al igual que en el tratamiento C con difenoconazole cuya producción de conidios fue inhibida en un 81,4 %. No se hallaron diferencias significativas en los restantes tratamientos ni en los suplementados con tebuconazole (tablas 57, 58, 59, 60; fig. 33).

### **Colonias en cultivo**

Según se observa en la lámina 9, no hubo desarrollo de colonia en ninguno de los tratamientos con carbendazím+epoxiconazole.

En los medios suplementados con flusilazole se obtuvieron colonias de no más de 5 cm de diámetro en el tratamiento A y en los B, C y D solo se desarrollaron sobre el disco de siembra. Hubo formación de conidios en todos ellos.

Con respecto a los medios con tebuconazole y difenoconazole se obtuvieron colonias que en ninguno de los tratamientos alcanzaron el borde de la caja de Petri, pero se observó que disminuían su tamaño a medida que aumentó la concentración de fungicida. En todos los casos se produjeron conidios (Lámina 12).

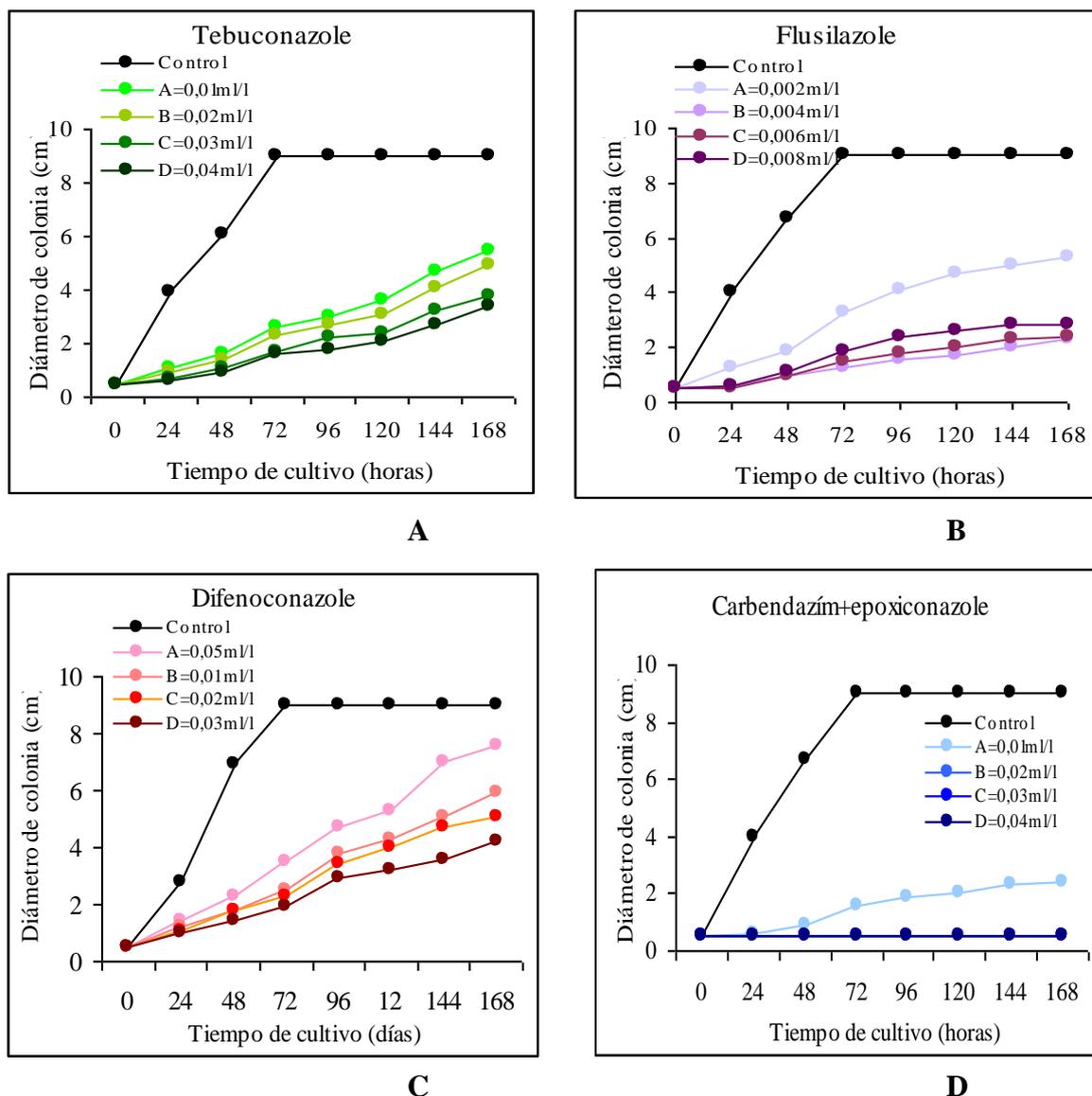
### **Crecimiento lineal (cm/h)**

El crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio APG suplementado con fungicidas, consta en la tabla 61 y en la fig. 32.

**Tabla 61.** Crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio APG suplementado con fungicidas.

		Diámetro de colonia (cm)							
		Tiempo de cultivo (horas)							
Fungicida(ml/l)	Control	0	24	48	72	96	120	144	168
<b>Tebuconazole</b>	Control	0,5	3,9	6,1	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	1,1	1,6	2,6	3	3,6	4,7	5,5
	B-0,02	0,5	0,9	1,4	2,3	2,7	3,1	4,1	4,9
	<b>C-0,03</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>1,7</b>	<b>2,2</b>	<b>2,4</b>	<b>3,2</b>	<b>3,8</b>
	D-0,04	0,5	0,6	0,9	1,6	1,8	2,1	2,7	3,4
<b>Difenoconazole</b>	Control	0,5	2,8	6,9	9	9	9	9	9
	A-0,5	0,5	1,4	2,3	3,5	4,7	5,3	7	7,6
	<b>B-1</b>	<b>0,5</b>	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	<b>2,5</b>	<b>3,8</b>	<b>4,3</b>	<b>5,1</b>	<b>5,9</b>
	<b>C-2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,1</b>	<b>1,8</b>	<b>2,3</b>	<b>3,4</b>	<b>4</b>	<b>4,7</b>	<b>5,1</b>
	D-3	0,5	1	1,4	1,9	2,9	3,2	3,6	4,2
<b>Flusilazole</b>	Control	0,5	4	6,7	9	9	9	9	9
	A-0,002	0,5	1,3	1,9	3,3	4,1	4,7	5	5,3
	B-0,004	0,5	0,6	1	1,3	1,6	1,7	2	2,3
	<b>C-0,006</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>1,8</b>	<b>2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>
	D-0,008	0,5	0,6	1,1	1,9	2,4	2,6	2,8	2,8
<b>Carbendazím +Epoiconazole</b>	Control	0,5	4	6,7	9	9	9	9	9
	A-0,01	0,5	0,6	0,9	1,6	1,9	2	2,3	2,4
	B-0,02	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	<b>C-0,03</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>
	D-0,04	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Nota: Los datos destacados en rojo corresponden a las dosis de campo.



**Fig. 32.** Crecimiento de *Trichoderma* sp. desarrollado en medio de cultivo APG suplementado con fungicidas.

Se observó que hubo inhibición del crecimiento en todos los tratamientos con fungicidas en relación al incremento de sus concentraciones, hallándose diferencias significativas en cada uno de los niveles evaluados.

Se destacó carbendazím + epoxiconazole por la mayor actividad fungicida, en éste se observó que solo en el tratamiento A hubo desarrollo de colonia, no encontrándose formación de micelio en los restantes tratamientos. Seguido en orden descendente de inhibición se encontraron flusilazole, tebuconazole y difenoconazole (fig. 32).

## CONCLUSIONES

### Herbicidas

- 1) Los herbicidas acetoclor, trifluralina, imazetapir, pendimetalín y metolacloro favorecieron la formación de esclerocios de *S. minor* en bajas concentraciones
  - a) Acetoclor y trifluralina tienen efecto estimulador de la formación de esclerocios de *S. minor* en todas las concentraciones evaluadas.
  - b) Imazetapir, metolaclor y pendimetalín reducen la producción de esclerocios solo en altas concentraciones.
  - c) Trifluralina, metolacloro y acetoclor favorecen la formación de esclerocios en las concentraciones equivalentes a las recomendadas a campo.
  - d) Las mezclas de herbicidas imazetapir+acetoclor no afectan la formación de esclerocios.
- 2) La formación de esclerocios de *S. rolfsii* es afectada de diferentes maneras por los herbicidas:
  - a) Imazetapir, acetoclor, metolacloro y la mezcla imazetapir+acetoclor 1:1,5 favorecen la formación de esclerocios.
  - b) Trifluralina y pendimetalín ejercen efecto inhibitorio de la formación de esclerocios.
- 3) *Trichoderma* sp es afectado de diferentes maneras por los herbicidas:
  - a) Acetoclor tiene un efecto positivo sobre la formación de conidios, incrementándose este efecto con el aumento de la concentración del herbicida.
  - b) Imazetapir y pendimetalín favorecen la formación de conidios en las respectivas concentraciones equivalente a las recomendadas a campo.
  - c) Trifluralina, metolacloro y la mezcla imazetapir+acetoclor 1:1,5 redujeron la formación de conidios.

### Fertilizantes

- 1) El nitrógeno en su forma inorgánica (nitrato o amonio) y orgánica, estimula la formación de distintas estructuras de *S. minor*:
  - a) El nitrato favorece el desarrollo de colonias pero inhibe la producción de esclerocios.
  - b) El amonio favorece el desarrollo de colonias y la producción de esclerocios .

- c) El nitrógeno orgánico favorece el desarrollo de colonias pero no la formación de esclerocios.
  - d) No se observa relación entre formación de esclerocios y la relación C/N.
- 2) *S. rolfsii* es capaz de utilizar nitrógeno en su forma inorgánica (nitrato o amonio) y orgánica para el desarrollo de colonias y producción de esclerocios.
- a) La producción de esclerocios es inhibida con la disminución de la relación C/N.
- 3) *Trichoderma* sp. es capaz de asimilar nitrógeno en su forma inorgánica (nitrato o amonio) y orgánica estimulando la producción de distintas estructuras:
- a) El nitrato de potasio y la urea influyen positivamente sobre la formación de conidios, mientras que el desarrollo de colonia no es significativo.
  - b) El nitrógeno orgánico favorece la formación de colonias pero no la producción de conidios.
  - c) La alta relación C/N estimula la formación de conidios, mientras que la baja la reduce, si el fosfato diamónico no estaba presente
- 5) Los tres hongos son capaces de crecer en el medio MS sin N, sin embargo solo *S. minor* y *Trichoderma* sp. manifestaron diferencias significativas en cuanto a la biomasa y cantidad de conidios respectivamente.

### **Fungicidas**

- 1) Los fungicidas afectan de diferente manera, según sea el fungicida, a la formación de esclerocios de *S. minor*:
  - a) Carbendazím+epoxiconazole, flusilazole y tebuconazole ejercen un mayor control sobre la formación de esclerocios *S. minor*.
  - b) Difenconazole estimula la formación de esclerocios con el incremento de su concentración.
- 2) *S. rolfsii* es afectado negativamente por tebuconazole, carbendazím+epoxiconazole, flusilazole y difenoconazole siendo flusilazole el de menor efecto inhibitorio.
- 3) *Trichoderma* sp. es afectado por todos los fungicidas evaluados según un gradiente de mayor a menor: carbendazim+epoxiconazole, flusilazole, tebuconazole y difenoconazole.

## CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Los agroquímicos (fertilizantes, herbicidas y fungicidas) empleados en el sistema productivo manisero de Córdoba, pueden haber favorecido el incremento del “tizón” (*Sclerotinia minor*) y del “marchitamiento” (*Sclerotium rolfsii*) del maní desde comienzos de la década de 1990.
- 2) Los agroquímicos aconsejables para su aplicación en el sistema productivo, según el criterio Backman *et al.* (1975) de seleccionar aquellos que controlando al patógeno afecte lo menos posible a controlador biológico natural *Trichoderma* sp. serían:

### *Herbicidas*

- a) Acetoclor
- b) Pendimetalín

### *Fertilizantes*

- a) Urea, empleado en sus concentraciones mínimas
- b) Nitrato de potasio

### *Fungicidas*

- a) Difenconazole

**CAPITULO VI**

**DISCUSION Y  
CONCLUSIONES**

---

## CAPITULO VI

### DISCUSION

#### Efecto de los herbicidas

##### *Sclerotinia minor*

Todos los herbicidas incluidos en este trabajo (acetoclor, imazetapir, metolacoloro, pendimetalín, trifluralina) favorecieron la producción de esclerocios en sus dosis menores, mientras que a mayores el comportamiento fue variable. Así, mientras con acetoclor y trifluralina se mantuvo el mismo efecto, con pendimetalín, imazetapir y metolacoloro hubo reducción de la formación de esclerocios asociada al aumento de la concentración. Además, con estos tres herbicidas no solo se produjeron menos esclerocios y de mayor tamaño a las mayores dosis, sino que también el patrón de distribución de los esclerocios sobre el medio de cultivo fue diferente. Así, mientras en presencia de metolacoloro se formó un anillo esclerocial continuando la colonia su crecimiento, con pendimetalín si bien se formó también un anillo esclerocial y con imazetapir varios en disposición concéntrica, en ambos casos las colonias no sobrepasaron su crecimiento a partir de ellos. Al respecto Bozarth y Tweedy (1971) demostraron que el tamaño de los esclerocios está inducido por la presencia de productos metabólicos como los ácidos orgánicos; sugiriéndose que los herbicidas podrían haber inhibido alguna vía metabólica causando su acumulación y consecuentemente el aumento del tamaño de los esclerocios, lo que pudo haber ocurrido en los tratamientos con pendimetalín.

En el medio adicionado con mezcla de imazetapir+acetoclor, el comportamiento de este hongo no coincidió con el obtenido sobre los herbicidas empleados separadamente. El patrón de distribución de esclerocios en la mezcla 1:1 tendió a distribuirse uniformemente y en la 1:1,5 formaron un anillo cercano al borde de la caja de Petri pero de aspecto “festoneado”. El número de esclerocios fue idéntico al del control en ambas mezclas. Es posible que el efecto inductor del acetoclor haya sido contrareestado por el imazetapir.

En distintos trabajos se ha demostrado que algunos pesticidas favorecen el desarrollo de los hongos a bajas concentraciones y lo reducen a altas, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo con metolacoloro, pendimetalín e imazetapir (Casale y Hart, 1986; Katan y Eshell, 1973; Wilcox, 1996). Por el contrario, otros

autores señalan que hay estimulación del crecimiento de hongos patógenos coincidentemente con lo observado en los medios suplementados con trifluralina y acetoclor (Altman 1969; Altman y Campbell, 1977; Sezgin, 1978; Altman y Rovira, 1989).

Es claro que de los herbicidas evaluados, los de mayor eficiencia para disminuir el potencial inóculo fueron metolacolor e imazetapir en las concentraciones más bajas. No obstante ello, el causante de mayor toxicidad sobre la colonia fue pendimetalín, ya que en su concentración más alta el micelio no continuó creciendo una vez formados los esclerocios.

### ***Sclerotium rolfsii***

El efecto adverso de las dinitroanilinas sobre diversos hongos ha sido señalado en numerosos trabajos (Wilcox, 1996; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1969; Teasdale *et al.*, 1978; Jonhson III *et al.*, 1994) habiéndose demostrado que afectan la división celular e inhiben la germinación miceliogénica de *S. rolfsii* (Radke y Grau, 1986). En el presente trabajo, pendimetalín y trifluralina, ambos herbicidas del grupo de las dinitroanilinas, ejercieron efecto negativo sobre la producción de esclerocios *S. rolfsii*. A este respecto es interesante señalar que Bozarth y Tweedy (1971) demostraron que trifluralina inhibió el crecimiento de *S. rolfsii* junto a otros tres herbicidas probados individualmente. Este herbicida resultó ser el que causó mayor reducción del número de esclerocios (45 %) a la concentración mínima. Experimentos realizados a campo recientemente, demostraron que una aplicación de dosis doble de trifluralina controla eficientemente el “marchitamiento del maní” (March, 2003, com. pers.).

Si bien metolacolor, acetoclor e imazetapir, favorecieron la formación de esclerocios a la mínima concentración, en las restantes la redujeron. Sanogo *et al.* (2000) comprobaron a través de estudios *in vitro*, que imazetapir redujo la formación de conidios de tres aislamientos de *Fusarium solani*, señalando la diversidad de efectos frente a distintos hongos de suelo.

Con imazetapir y metolacolor se destacó una estimulación en la formación de esclerocios a bajas concentraciones seguido de un notable efecto inhibitorio a medida que aumentaba su concentración, lo que coincide con trabajos previos en los que se observó que algunos herbicidas estimulan a bajas concentraciones y reducen a altas. Considerando estos resultados y que en general las concentraciones de los herbicidas en suelo disminuyen por infiltración, evaporación, fotodescomposición y descomposición

microbiana, es posible que una situación análoga ocurra a campo también con estos herbicidas.

Por otra parte, como también fue afectada la viabilidad de los esclerocios, el potencial inóculo de *S. rolf sii* está representado por el número de esclerocios producidos y viables. Así, el herbicida que más afectó la viabilidad fue pendimetalín, seguido por acetoclor, trifluralina, metolacolor e imazetapir.

Imazetapir fue el herbicida que produjo la mayor cantidad de esclerocios y a su vez los de más elevada viabilidad; por el contrario pendimetalín fue el herbicida de mayor acción fungicida, por afectar tanto la producción de los esclerocios como su viabilidad.

En los tratamientos suplementados con la mezcla de imazetapir+acetoclor, no se observaron resultados similares a aquellos obtenidos con los herbicidas adicionados individualmente. Es factible que por mezclarlos se haya producido una respuesta intermedia.

### ***Trichoderma sp.***

En general *Trichoderma sp.* no fue afectado en forma notable por los herbicidas evaluados en este trabajo. Sin embargo, es interesante señalar que con acetoclor e imazetapir se observó una tendencia a incrementar la formación de conidios con el aumento de la concentración.

La trifluralina afectó desfavorablemente la formación de conidios en todas las concentraciones, mientras que pendimetalín la estimuló. Metolacolor se comportó de manera similar a esta última.

En los tratamientos con la mezcla de imazetapir+acetoclor, al igual que con *S. minor* y *S. rolf sii*, aumentó la formación de conidios cuando fueron empleados individualmente, pero al mezclarlos no se diferenciaron significativamente del control.

Alvarez *et al.* (1994), al evaluar especies celulolíticas presentes en el suelo luego de aplicación de herbicidas, demostraron que había mayor diversidad de especies fúngicas celulolíticas durante los 7 primeros días luego de aplicación de los herbicidas, lo que implica no solo que las especies tuvieron una buena tolerancia al agroquímico, sino que probablemente hayan sido capaces de utilizarlo como nutriente. Por su parte, Haney *et al.* (2002) indicaron que la mineralización del carbono y el nitrógeno fue sensible al agregado de glifosato y atrazina. El agregado de estos herbicidas de baja relación C/N estimuló la actividad microbiana, aumentando consecuentemente la

mineralización. Es posible que un mejor aprovechamiento de la fuente de energía sean la/las razones del incremento causado por el acetoclor.

## **Efecto de los fertilizantes**

### ***Sclerotinia minor***

Los resultados obtenidos indican que hubo una correlación positiva entre la forma de nitrógeno disponible y los esclerocios producidos. Si bien se formaron esclerocios en los tratamientos con nitrato de potasio no superaron al control; por el contrario, en los suplementados con compuestos amoniacales lo superaron ampliamente. Coincidentemente a lo afirmado por Huber y Watson (1974), como está involucrado un amplio rango de interacciones fisiológicas en la relación parásito-hospedante, no hay ningún modelo fisiológico simple que represente estas interacciones. Generalmente es la forma en que se presenta el nitrógeno, lo que afecta la severidad de la enfermedad o la resistencia a la misma más que la cantidad.

En los tratamientos de concentraciones intermedias se destacó el fosfato diamónico, el cual favoreció la formación de esclerocios más que en el control. No obstante esto, el peso de la masa esclerocial se mantuvo sin diferencias significativas, lo que implica que el tamaño de los esclerocios disminuyó. Es posible que el amonio haya sido aprovechado directamente (Paul y Clark 1989), por lo que se infiere que la enorme diferencia de cantidad de esclerocios fue debida a la máxima asimilación del nitrógeno por la completa disponibilidad de la fuente de carbono aportada por el APG y la ausencia de nitratos.

Los experimentos con nitrato de potasio demostraron que se produjo una reducción en el número de esclerocios en todos los tratamientos respecto del control, sin embargo su peso en los tratamientos correspondientes a las concentraciones más bajas fue disminuyendo a medida que incrementaba la concentración, por aumento del peso unitario de los esclerocios producidos. La menor formación de esclerocios podría deberse a que el crecimiento a expensas del nitrato tiene un coeficiente de mantenimiento considerablemente mayor respecto al uso de las otras fuentes de nitrógeno alternativas, lo que se quedó reflejado en las pendientes de las curvas de crecimiento, realizadas en el ensayo de asimilación de nitrógeno.

Con respecto al nitrato de amonio, donde se observó un descenso en la cantidad de esclerocios asociado al incremento de la concentración, y considerando que la

reducción del nitrato no se realiza hasta que el amonio sea consumido, es posible que este último haya sido utilizado inicialmente sumado al efecto inhibitorio del nitrato.

Por su parte, los medios con urea fueron los únicos que indujeron mayor producción de esclerocios en las concentraciones más altas. La colonia desarrollada en éstas tuvo un patrón de crecimiento distinto del control, con escaso crecimiento y esclerocios periféricos, evidenciando situación de estrés. Se debe tener en cuenta que el C producido por la hidrólisis de la urea no es asimilable (Madan y Thind, 1998).

Huber *et al.* (1965) demostró que la forma de nitrógeno es el factor determinante que modifica la severidad de las enfermedades por los microorganismos de suelo. Según este autor, el tipo de fuente de nitrógeno influye sobre la producción de esclerocios de *S. minor*, estando relacionado además con la relación C/N, en la que el C disponible limita o induce la asimilación de nitrógeno y subsiguiente formación de esclerocios. En este trabajo se observó que en los tratamientos con nitrato hubo notables diferencias de producción de esclerocios respecto de aquellos con amonio. Esto podría atribuirse a que la asimilación de nitrato requiere mayor consumo de mantenimiento y ejerce efecto adverso sobre la producción de esclerocios. Al respecto, Tanrikut y Vaughan (1951) demostraron que el crecimiento radial de *S. sclerotiorum* disminuyó por la presencia de nitrato de sodio, pero no afectó la formación de esclerocios. Los mismos autores sostuvieron que de los nutrientes evaluados, solamente nitrógeno, fósforo y hidratos de carbono parecieron ser importantes en el crecimiento de las colonias y en la formación de esclerocios por *S. sclerotiorum*. Además, encontraron que el desarrollo de este hongo fue similar al reemplazar el amonio por el nitrato, creciendo normalmente sobre un medio con nitrato de amonio al igual que cuando se agregaron nitrato y amonio individualmente. Teniendo en cuenta estas consideraciones con respecto a la asimilación de nitrógeno por *S. minor*, y siendo la cantidad de carbono disponible la misma en todos los medios probados, los resultados no coincidieron con los obtenidos en cuanto a la formación de esclerocios; aunque es importante señalar que Tanrikut y Vaughan (1951) no hicieron referencia a la cantidad de C disponible en el medio de cultivo.

Por su parte, en el ensayo de asimilación de nitrógeno la velocidad de crecimiento en medio adicionado con fosfato diamónico fue mayor a la obtenida con urea y nitrato de potasio, siendo similares entre sí las correspondientes a estas dos últimas. Es posible que la hidrólisis de la urea y reducción del nitrato, metabolismos dirigidos a obtener amonio, hayan empleado parte del C disponible como fuente de

energía para dicho metabolismo, mientras que en presencia de amonio este fue incorporado directamente sin transformaciones, produciendo consecuentemente mayor rendimiento en la cantidad de esclerocios producidos.

En cuanto a la biomasa desarrollada, no se evidenciaron preferencias por amonio o nitrato. Tanto en los medios suplementados con urea, como los de nitrato de potasio y fosfato diamónico, si bien desarrollaron más biomasa que sobre el control, no se diferenciaron significativamente de él. Además se evidenció que este parámetro de crecimiento no fue afectado por la relación C/N, ya que no se observaron diferencias entre la obtenida en APG con el medio MS, cuyas relaciones C/N son de valores opuestos (33,2/1; 0,75/1; respectivamente).

Considerando que la colonia de *S. minor* en el medio MS sin N fue similar a la desarrollada en el medio provisto de nitrógeno, surge el interrogante de cuál fue el origen de este último. A este respecto, Tanrikut y Vaughan (1951) mostraron que *S. sclerotiorum* se desarrolla sobre medio de cultivo sin nitrógeno, produciendo colonias delgadas, escasas y con pocos esclerocios que cubren toda la caja luego de 3-5 días.

Por su parte, Wang y Tourneau (1972) afirmaron que *S. minor* es capaz de asimilar el nitrógeno orgánico, aunque no siempre favorece la formación de esclerocios, coincidiendo con los resultados obtenidos en estos estudios.

Del presente trabajo surge que *S. minor* es capaz de asimilar amonio o nitrato y también nitrógeno orgánico.

### ***Sclerotium rolfsii***

Si bien no se encontraron diferencias significativas en la producción de esclerocios de *S. rolfsii* frente a fertilizantes nitrogenados, se observó una disminución del número de esclerocios con el aumento en la concentración de los fertilizantes. Se destacó el medio con urea por haberse desarrollado los esclerocios de mayor tamaño en las concentraciones más altas.

Los resultados coinciden con trabajos realizados anteriormente en cultivo *in vitro* (Avizohar-Hershenson y Shacked, 1968) y a campo, empleando concentraciones superiores a las equivalentes de este trabajo, las que produjeron una disminución en las enfermedades causadas por *S. rolfsii* (Punja, 1989). Al contrario de estos resultados, Lakpale *et al.* (1995) comprobó por estudios *in vitro* que urea y nitrato de potasio inducían la formación de mayor cantidad de esclerocios de *R. solani*. Estos resultados indican el diferente efecto de los fertilizantes según sea la especie fúngica.

En las pruebas de viabilidad se recolectaron más esclerocios que los sembrados. Esto ocurrió tanto en el control como en los tratamientos, sin embargo la diferencia fue mayor, aunque no significativa, en los tratamientos correspondientes a las concentraciones más bajas, posiblemente debido a diferente contenido de energía endógena en los esclerocios desarrollados sobre los diferentes medios. A este respecto, Rago *et al.* (1997) señalaron las marcadas diferencias de energía endógena disponible en los esclerocios según sea el sustrato sobre el cual se hayan desarrollado.

Henis y Chet (1968) demostraron que exceptuando el amoníaco, ninguna enmienda nitrogenada ejerció efecto tóxico sobre la germinación de esclerocios, solo afectaron indirectamente incrementando la actividad antagonista de los microorganismos de la interfase esclerocio/suelo. No obstante no se hizo mención en ninguna publicación consultada respecto a que se produjeran esclerocios *de novo* en alguno de los tratamientos.

En los ensayos de asimilación de nitrógeno, en general la cantidad de esclerocios producidos fue similar en todos los medios evaluados excepto con MS y APG, los que produjeron 2,9 y 3,8 veces más esclerocios que la media de los restantes tratamientos, respectivamente. Punja (1989) planteó como necesario una baja relación C/N para que se induzca la formación de esclerocios y alta para que haya abundante desarrollo de estos, coincidiendo con los resultados de este trabajo, ya que en el medio MS y APG la relación C/N fue 0,75/1 y 33,6/1 respectivamente, mientras que en el resto fue 6/1.

Es interesante señalar que las colonias de *S. rolfsii* en urea fueron las de crecimiento más rápido, pero produjeron menos esclerocios, siguiéndole las desarrolladas en fosfato diamónico y nitrato de potasio. Además se observó que la curva de crecimiento en MS sin N + tripteína fue similar a la obtenida en APG, pero en este último la cantidad de esclerocios formados fue 2,8 veces superior.

Por su parte, la colonia correspondiente a MS sin N mostró una curva de crecimiento medido como incremento del diámetro similar al control, no obstante esta última tenía aspecto translúcido y casi imperceptible a simple vista. Al igual que con *S. minor*, surge el interrogante de cuál fue el origen del nitrógeno empleado para este crecimiento.

Considerando los resultados de la producción de esclerocios obtenidos en medios con fertilizantes nitrogenados, adicionados con distintas fuentes de nitrógeno y evaluados en un amplio rango de relación C/N (4/1-30/1), podría inferirse que la producción de esclerocios es directamente proporcional a la relación C/N. En las

experiencias con fertilizantes nitrogenados esto se comprobó en las concentraciones más bajas, en las que al suplementarle nitrógeno disminuyó la producción de esclerocios.

### ***Trichoderma sp.***

Hubieron dos efectos opuestos en la formación de conidios según sea el fertilizante y la concentración empleada. Las concentraciones menores, suplementadas con nitrato de amonio, nitrato de potasio y urea promovieron la formación de conidios, no así con fosfato diamónico. No obstante, en todos los fertilizantes evaluados las concentraciones más altas produjeron efecto inhibitorio en la formación de conidios.

Es posible que en los medios con nitrato de amonio la fuente de carbono debió distribuirse entre asimilación de amonio, reducción del nitrato y asimilación del amonio resultante, obteniéndose como consecuencia menor rendimiento en la producción de conidios.

Si bien no se observaron diferencias en el desarrollo de las colonias alcanzándose el diámetro máximo a las 72 hs, en todos los experimentos se produjo un retraso de su avance a las 48 horas, siendo más notable a medida que aumentaba la concentración del fertilizante empleado.

En el ensayo de asimilación de nitrógeno, las diferentes fuentes de nitrógeno no afectaron significativamente el crecimiento de las colonias, excepto en los medios con MS sin N + caseína y MS que alcanzaron el borde de la caja a las 96 h, en lugar de 72 h como el resto, y el control que no completó su crecimiento.

Por el contrario, sí fue afectada la producción de conidios, la que fue significativamente superior en los medios de cultivo suplementados con nitrato de potasio y urea, no así con fosfato diamónico, lo que coincide con los experimentos de fertilizantes.

Según Fang y Liu (1988), *T. harzianum* es un hongo productor de ureasa, lo que explicaría el significativo aumento de conidios en presencia de urea.

Con respecto al fosfato diamónico, no hubo diferencias en la cantidad de conidios producidos entre el control APG y los tratamientos, y en el ensayo de asimilación de nitrógeno fueron escasos. Sin embargo, quedó demostrado que es capaz de asimilar amonio porque en los medios con urea hubo un notable crecimiento. La presencia del fosfato tendría entonces efecto inhibitorio sobre la asimilación del amonio. De manera similar con el medio MS, conteniendo ambos tipos de nitrógeno la cantidad de conidios no se diferenció del control, sin embargo la formulación de este medio

contiene fosfato de potasio el que puede haber ejercido también en este caso efecto inhibitorio. Una suposición alternativa respecto al medio MS es que la relación C/N sea demasiado baja para los requerimientos de este hongo.

Con MS sin N + caseína y tripteína el desarrollo de conidios fue muy escaso, aún cuando la colonia producida resultó similar a la de los restantes tratamientos.

Por otra parte, conidios obtenidos sobre el medio MS sin N fue semejante a la producida sobre urea y nitrato de potasio, no habiéndose determinado cuál fue el origen del N en estos medios.

Al correlacionar estos resultados con la relación C/N surge que cuando es excesivamente baja hay menor formación de conidios. Esto se comprobó en el experimento con fertilizantes en el que se formaron menor cantidad de estos a medida que aumentaba el N en el medio.

## **Efecto de los fungicidas**

### ***Sclerotinia minor***

En general, difenoconazole estimuló la formación de esclerocios a medida que aumentó su concentración, no obstante tuvo efecto tóxico sobre la colonia. En efecto, mientras el crecimiento de la colonia se restringió, la vía metabólica de producción de esclerocios no resultó alterada, o quizás se activó el mecanismo de sobrevivencia del hongo formando sus estructuras de resistencia frente a las condiciones adversas de crecimiento. Por el contrario, con tebuconazole, flusilazole y carbendazím+epoxiconazole hubo escasa formación de esclerocios en la concentración más baja, observándose una alta eficiencia fungicida en los restantes tratamientos. Los resultados correspondientes a carbendazím son coincidentes con los de Singh y Kapoor (1996) trabajando con *S. sclerotiorum*, pues demostraron que este fungicida inhibió el crecimiento micelial con efecto adverso sobre la producción de esclerocios. De manera similar, Porter y Lankow (1981) en sus experimentos *in vitro* con *S. minor*, demostraron que el crecimiento micelial y la producción de esclerocios fue inhibida por benomyl, fungicida del grupo de los bencimidazoles al igual que carbendazím. Por el contrario, Adams y Wong (1991) encontraron que *S. minor* no fue afectado por benomyl cuando fue aplicado al suelo.

### ***Sclerotium rolfsii***

En coincidencia con los resultados de este trabajo, distintos autores han demostrado la actividad fungicida de tebuconazole y difenoconazole sobre *S. rolfsii in vitro* y a campo (Adiver y Anahosur, 1995; Bowen *et al.*, 1997; Brenneman *et al.*, 1991).

Por su parte flusilazole y carbendazím+epoxiconazole en las concentraciones más altas afectaron también el desarrollo de las colonias de *S. rolfsii* y en distinto grado la formación de esclerocios. A este respecto, Rondon *et al.* (1995) comprobaron que carbendazím *in vitro* afectaba la producción de esclerocios solamente a elevadas concentraciones. Sin embargo Backman *et al.* (1975) indicaron que benomyl no tuvo actividad *in vitro* sobre *S. rolfsii*.

### ***Trichoderma* sp.**

En general, todos los experimentos afectaron la formación de conidios y el desarrollo de colonias, pero carbendazím+epoxiconazole resultó altamente tóxico, ya que en ninguno de los tratamientos hubo desarrollo de colonia ni de conidios. Viji *et al.*, (1997) encontraron resultados similares cuando evaluaron el efecto de carbendazím y benomyl, los que suprimieron totalmente el crecimiento de *Trichoderma* sp. en ensayos *in vitro*. La respuesta diferencial de los antagonistas a los fungicidas podría deberse a su resistencia inherente a la mayoría de ellos y su capacidad para degradarlos (Viji *et al.*, 1997). También Backman *et al.* (1975) los que evaluaron la relación entre la incidencia de *S. rolfsii* y la toxicidad de los fungicidas para control de la viruela del maní, determinando la actividad *in vitro* y a campo de benomil y clorotalonil, sobre *Trichoderma* sp. y *S. rolfsii* benomil no tuvo efecto sobre *S. rolfsii*, pero resultó altamente tóxico para *Trichoderma* sp., registrándose a campo un aumento significativo de la severidad de la enfermedad. Por su parte, clorotalonil *in vitro* fue altamente tóxico para *S. rolfsii*, mostrando escasa actividad sobre *Trichoderma* sp., sin observarse cambios notables a campo en la severidad de la enfermedad. Estos resultados demuestran el importante rol de *Trichoderma* sp. como antagonista de *S. rolfsii*

En general, con flusilazole hubo escasa formación de conidios excepto en la concentración más baja. Con respecto a tebuconazole y difenoconazole se observó actividad antifúngica tanto en la producción de conidios como en el desarrollo de colonia, evidenciándose una disminución del crecimiento en ambos parámetros a medida que aumentó la concentración del fungicida. Según Mondal *et al.* (1995), el

micelio de seis especies de *Trichoderma* fue inhibido por el agregado de carbendazím y tebuconazole al medio de cultivo.

Por lo anteriormente expuesto es posible ordenar los fungicidas de mayor a menor grado de toxicidad respecto a *Trichoderma* sp.: carbendazím+epoxiconazole, flusilazole, tebuconazole y difenoconazole.

**CAPITULO VII**

**BIBLIOGRAFIA**

---

## CAPITULO VII

### BIBLIOGRAFIA

1. ADAMS, P. and WONG, J. L.-A. 1991. The effect of chemical pesticides on the infection of sclerotia of *S. minor* by the biocontrol agent *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology* 81:1340-1343.
2. ADIVER, S. S. and ANAHOSUR, K. H. 1995. Efficacy of some triazole fungicides against late leaf of groundnut and their subsequent effects on *S. rolf sii*. *Indian Phytopath.* 48:452-462.
3. AGRIOS, G. N. 1991. Concepto de enfermedad en las plantas. In: *Fitopatología*. Academic Press Inc. Versión en español editada por Limusa S. A. México. Pgs. 530.
4. ALTMAN J. 1969. Predisposition of sugarbeets to *R. solani* damping-off with herbicides. *Phytopathology* 59:1015.
5. ALTMAN, J. and CAMPBELL, C. L. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15:361-85.
6. ALTMAN, J. and ROVIRA, A. D. 1989. Herbicide-pathogen interaction in soil borne root disease. *Can. J. of Plant Path.* 11:166-172.
7. ALVAREZ, D. P. y ROSSI, G. S. 1993. Producción de celulasas por cepas de *Aspergillus niger* y *T. harzianum* aisladas de suelos tratados con fluroxypyr. *Bol. Micol.* 8:71-75.
8. ALVAREZ, D. P.; LUQUE, G. A. y PAPA, J. C. 1994. Efecto de herbicidas para malezas en el cultivo de trigo sobre la micota total de suelo. *Revista Investigaciones Agrarias (RIA)*. 25:83-94.
9. AVIZOHAR-HERSHENZON, Z. and SHACKED, P. 1968. Studies on the mode of action of inorganic nitrogenous amendaments on *S. rolf sii* in soil. *Phytopathology* 59:288-292.
10. BACKMAN, P. A.; RODRIGUEZ KABANA, R. and WILLIAMS, J. C. 1975. The effect of peanut leafspot fungicides on the "nontarget" pathogen *S. rolf sii*. *Phytopathology* 65:773-776.

11. BAKER, K. F. and COOK, R. J. 1982. Role of the physical environment in biological control. In: Biological control of plant pathogens. Amer. Phytopathol. Soc. St Paul MN. Pgs. 433.
12. BASU, A. and SEN GUPTA, P. K. 1996. Effect of forms of nitrogen fertilizers on sheath blight of rice. Indian Phytopath. 49:87-88.
13. BERING, D. E. 1974. R Factor tranferation in *Rhizobium leguminosarum*. Journal of Microbiology 84:188-198.
14. BIÇICI, M.; CINAR, O. and ERKILIÇ, A. 1994. Cultural, chemical, physical and biological methods to control stem rot, *S. rolfsii* Sacc., in peanut. Turkish Journal of Agricultural & Forestry 18:423-435.
15. BOWEN, K. L.; HAGAN, A. K. and WEEKS, J. R. 1997. Number of tebuconazole applicatios for maximizing disease control and yield of peanut in growers fields in Alabama. Plant Disease 81:927-931.
16. BOZARTH, G. A. and TWEEDY, B. G. 1971. Effect of pesticides on growth and sclerotial production of *S. rolfsii*. Phytopathology 61:1140-1142.
17. BRENNEMAN, T. B.; MURPHY, A. P. and CSINOS, A. S. 1991. Activity of tebuconazole on *S. rolfsii* and *R. solani*, two soilborne pathogens of peanut. Plant Disease 75:744-747.
18. BRUHEL, G. W. 1989. Integrated control of soil-borne plant pathogens: an overview. Can. J. of Plant Path. 11: 153-157
19. BUTTERFIELD DE VAY, E. J. 1977. Reassessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. Phytopathology 67:1073-1078.
20. CAMPBELL, C. L. and MADDEN, L. V. 1989. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley-Interscience publication. 531 pgs.
21. CASALE, W. C. and HART, L. P. 1986. Influence of herbicides on carpogenic germination development of *S. sclerotiorum*. Phytopathology 76:981.
22. CHAGEDOR. 1998. Biogeochemicals cycles . Soil microbiology. BIOL/CSES 4684. The Nitrogen cycle: Denitrification. 2002. [www.bsi.vt.edu/chagedor/biol\\_4684/Cycles](http://www.bsi.vt.edu/chagedor/biol_4684/Cycles)
23. CHUN, D. and LOCKWOOD, J. L. 1985. Reductions of *Pythium ultimum*, *Thielaviopsis basicola* and *Macrophomina phaseolina* in soil associated with ammonia generated from urea. Plant Disease 69:154-158.
24. CIAFA - CAMARA INDUSTRIAL DE FERTILIZANTES Y AGROQUÍMICOS. 2002. [www.ciafa.gov-ar](http://www.ciafa.gov-ar)

25. CSINOS, A. S. and BELL, D. 1989. Pathology and nutrition in the peanut pod rot complex. In: Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro-microelements. Edit.: Arthur W. Engelhard.
26. CURL, E. A. and FUNDERBURCK, H. H. Jr. 1965. Some effects of atrazine on *S. rolfsii* and inhibitory soil microorganism. *Phytopathology* 55: 373-496.
27. DARWICH, N. A. 1994. Fertilización y competitividad en los '90. *Campo y Tecnología* 13:28-32.
28. DUBEY, H. D. 1959. Influence of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizer on the mortality of peanut caused by root rot disease. *Agronomy Journal* 51:369-370.
29. ERHARDT, P. 1981. Diluent and Biomass measurement. In: Manual of methods for general bacteriology. Author: P. Erhardt. A.S.M. Washington D. C. Pgs 505.
30. FANG, H. C. and LIU, T. M. E. 1988. Effect of urea nitrogenous compounds on the sclerotial germination and viability of the *S. rolfsii* in soil and its relationship with soil microorganism. *Plant Prot. Bull.* 30:235-244.
31. FERNANDEZ VALIELA, M. V. 1979. Introducción a la Fitopatología. INTA. Buenos Aires. Vol. IV: Hongos y Micoplasmas.
32. FREZZI, M. J. 1960. Enfermedades del mani en la provincia de Córdoba. *RIA XIV* 2:113-155.
33. FORMENTO, L. E. 1998. Actividad antagónica de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp. sobre *S. rolfsii*. Seminarios I y II de la Carrera de Ciencias Biológicas. Facultad de Cs. Ex., Fís.y Nat. Universidad Nacional de Córdoba.
34. GODOY, I. J. and GIANDANA, E. H. 1992. Groundnut production and research in south America. Pgs. 75-85. Proceedings of an International Workshop. ICRISAT. India.
35. GUÍA DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS. 1995. Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes. Editorial Casafe. República Argentina.
36. GUÍA PRÁCTICA DEL CULTIVO DE MAÍZ. 1997. Cambio rural. INTA. Secretaría de agricultura, pesca y alimentación. Buenos Aires. Argentina. Pgs.149.
37. HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; KRUTZ, L. J. and HONS, F. M. 2002. Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. [www.link.springer.de/link/service/journals/00374/contents/01/00437/paper/](http://www.link.springer.de/link/service/journals/00374/contents/01/00437/paper/)

38. HENIS, Y. and CHET, I. 1968. The effect of nitrogenous amendaments on the germinability of sclerotia of *S. rolf sii* and on their accompanying microflora. *Phytopathology* 58:209-214.
39. HUBER, D. M. 1990. Fertilizers and soilborne disease. *Soil use and management* 6:168-173.
40. HUBER, D. M. 1997. Manejo de nutrición para el combate de patógenos de plantas. *Agronomía costarricense* 21:99-102.
41. HUBER, D. M. and WATSON, R. D. 1970. Effect of organic amendament on soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 60:22-26.
42. HUBER, D. M.; WATSON, R. D. and STEINER, G. W. 1965. Crop residues, nitrogen and plant disease. *Soil Science* 100:302-306.
43. HUBER, D. M. and WATSON, R. D. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 12:139:165.
44. JOHNSON III, W. C.; BRENNEMAN, T. B. and MULLINIX, Jr. B. G. 1994. Chloroacetamide herbicides and chlorimuron not predispose peanut (*Arachis hypogaea*) to stem rot (*S. rolf sii*). *Peanut Science* 21:126-129.
45. KASICA, A. F. 2002. Something to grown on. Nitrogen forms and available fluctuate within the soil. Nitrate loss. [www.cals.cornell.edu/dept/flori/growon/nitrogen](http://www.cals.cornell.edu/dept/flori/growon/nitrogen)
46. KATAN, J. and ESHEL, Y. 1973. Interaction between herbicides and plant pathogens. *Residue Review* 45:145-177.
47. LAKPALE, N.; THRIMURTY, V. S. and AGARWAL, K. C. 1995. *In vitro* response of paddy isolate of *R. solani* to different carbon and nitrogen sources. *Indian J. Mycol. Pathol.* 25(3):291-292.
48. LAZAROVITS, G. 2001. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendaments a disease control strategy salvaged from the past. *Can. J. Plant Pathol.* 23:1-7.
49. LEACH, L. D. and DAVEY, A. E. 1935. Toxicity of low concentration of amonia to mycelium and sclerotia of *S. rolf sii*. *Phytopathology* 25:957-959.
50. LECUONA, R. E. 1996. Bioensayos. Técnicas empleadas con hongos entomopatógenos. Pág. 148-150. En: *Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos*. Editor: Roberto E. Lecuona.
51. LEVESQUE, C. A. and RAHE, J. E. 1992. Herbicide interaction with root pathogens, with special reference to glyphosate. *Annu. Rev. Phytopath.* 30:579-602.

52. MADAN, M. and THIND, K. S. 1998. Physiology of fungi. APH publishing corporation. Pgs 213.
53. MARCH, G. J. y MARINELLI, A. 1995. Enfermedades del maní y sistema productivo. Maní: Avances en investigación 2:2-18.
54. MARCH, G.; MARINELLI, A.; ODDINO, C.; KEARNEY, M.; PASTOR, S.; VARGAS GIL, S.; GIUGGIA, J.; REMEDI, D. and JUSTIANOVICH, C. 2001. Groundnut Crop Loss by Pod rot. International Arachis newsletter 21:36.
55. MARCH, G.; MARINELLI, A.; RAGO, A. y GIUGGIA, J. 1998. Curvas de desarrollo del "marchitamiento" del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *S. rolfsii* Sacc. en Argentina. Bol. San. Veg. Plagas 24:511-518.
56. MARINELLI, A. y MARCH, G. 1996. Epidemias del "tizón" del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary y *S. minor* Jagger en Argentina. Bol. San. Veg., Plagas 22:501-510,1996.
57. MARINELLI, A. y MARCH, G. J. 2002. Enfermedades del maní en Argentina. Guía ilustrada para identificación a campo. 45 Pgs.
58. MARINELLI, A.; RAGO, A.; MARCH, G. J. y GIUGGIA, J. 1995. Enfermedades causadas por hongos patógenos presentes en el suelo durante la campaña agrícola 1996/97. X Jornada Nacional del maní. Resumen pg. 10.
59. MARINELLI, A.; MARCH, G.; RAGO, A. y GIUGGIA, J. 1996. Enfermedades causadas por hongos patógenos presentes en el suelo, campañas agrícolas 1994/95 y 1995/96. XI Jornada Nacional del Maní. Resumen pg. 4.
60. MARINELLI, A.; MARCH, G. J.; RAGO, A. y GIUGGIA, J. 1998. Assessment of crop loss in peanut caused by *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. rolfsii* in Argentina. International Journal of Pest Management 44:251-254.
61. MARINELLI, A.; MARCH, G.; RAGO, A.; GIUGGIA, J. y KEARNEY, M. 2001. Epidemiología del tizón del maní (*Arachis hypogaea* L.) causado por *S. minor* Jagger en Argentina. Bol. San. Veg. Plagas 27:75-84.
62. MERCK, E. 1982. Manual de medios de cultivo. Pgs.189. Darmstadt 1. Alemania.
63. MITIDIARI, I. Z. M. 1983. Podredumbre del tallo de la soja (*S. minor* Jagger). RIA 18: 31-45.
64. MITIDIARI, I. M. 1986. Control Biológico de hongos de suelo con *Trichoderma* sp. VI Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Ciudad de Neuquén.

65. MONACO, C. 1990. Evaluación de la eficiencia de micoparásitos sobre esclerocios de *S. sclerotiorum in vitro*. Revista de la Facultad de Agronomía. Univ. Nac. de La Plata 65:67-73.
66. MENENDEZ, A. y GODEAS, A. M. 1995. Capacidad antagónica de algunos micoparásitos de esclerocios de *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary presentes en la región de Pergamino, Argentina. Revista de la Facultad de Agronomía. Univ. Nac. de La Plata 71:67-72.
67. MONDAL, G.; SRIVASTAVA, K. D. and AGGARWAL, R. 1995. Antagonist effect of *Trichoderma* sp. on *Ustilago segetum* var. *tritici* and their compatibility with fungicides and biocides. Indian Phytopath. 48:466-470.
68. MWANZA, C. y BLANCO-LOPEZ, M. A. 1999 Dpto. de Agronomía. ETSIA. Universidad de Córdoba. Apdo. 3048. 14080. Córdoba. España.
69. NEUBAUER, R. and AVIZOHAR-HERSHENSON, Z. 1973. Effect of the herbicide, trifluraline on *Rhizoctonia* disease in cotton. Phytopathology 63:651-652.
70. PAPAIVIZAS, G. C. and LEWIS, J. A. 1989. Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean by *S. rolfsii* in the greenhouse. Plant Pathology 38:277-286.
71. PAUL, E. A. and CLARK, F. E. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich. Publishers.
72. PEREYRA, V. R. y ESCANDE, A. R. 1994. Podredumbre blanda del capítulo provocada por *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Enfermedades del girasol en la Argentina. Sociedad Impresora Americana. Buenos Aires. Pgs. 75-84.
73. PIDWIRNY, M. J. 2002. Fundamentals of Physical Geography. Introduction to Biogeography and Ecology. The Nitrogen Cycle. [www.geog.ouc.bc.ca/physgeog/contents.9s.html](http://www.geog.ouc.bc.ca/physgeog/contents.9s.html)
74. PIETRARELLI, J. R. 1986. Maní, historia, importancia, técnica de cultivo, uso y comercialización. Cuaderno de Actualización Técnica. N° 3. INTA EEA Manfredi.
75. PORTER, D. M. 1980. Increased severity of sclerotinia blight in peanut treated with captafol and chlorotalonil. Plant Disease 64:394-395.
76. PORTER, D. M. and RUD, O. E. 1980. Suppression of sclerotinia blight of peanuts with dinitrofenol herbicides. Phytopathology 70:720.

77. PORTER, D. M. and LANKOW, R. K. 1981. Growth of *S. minor* on media containing chlorotalonil and benomyl. *Plant Disease* 65:591-594.
78. PUNJA, Z. K. 1989. Soilborne plant pathogens: Management of diseases with macro and micro elements. Edit. Arthur W. Engelhard. St. Paul Minn. APS Press.
79. PUNJA, A. K.; GROGAN, R. G., and UNRUH, T. 1982. Comparative control of *S. rolfii* on golf greens in Northern California with fungicides inorganics salts and *Trichoderma* sp. *Plant Disease* 66:1125-1128.
80. RADKE, V. L. 1986. Effect of herbicides on carpogenic germination of *S. sclerotiorum*. *Plant Disease* 70:19-23.
81. RAGO, A.; MARCH, G. J. MARINELLI, A. 1997. Efecto de diferentes residuos vegetales sobre la producción de esclerocios de *S. rolfii*. *Fitopatología* 32:121-125.
82. REICHARD, S. L.; SULC, R. M. and RHODES, L. H. 1997. Growth and reproduction of *S. trifoliorum* as influenced by herbicides. *Mycologia*. Bronx New York Botanical Garden 1909. Jan/Feb. 89 (1).
83. REINERSTEN, S. A.; ELLIOT, L. F.; COCHRAN, V. L. and CAMPBELL, G. S. 1984. Role of available carbon and nitrogen in determining the rate of wheat straw decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 16:459-464.
84. RODRIGUEZ-KABANA, R.; CURL, E. A. and FUNDERBURK, H. H. Jr. 1969. Effect of trifluralin on growth of *S. rolfii* in liquid culture and soil. *Phytopathology* 59:228-232.
85. RONDON, A.; FLORES, Y.; SOTO, E. y MUJICA, Y. 1995. Control químico *in vitro* y en umbráculo del hongo causante de la pudrición blanca. *Rev. Fac. Agron. Venezuela* 12:1-3.
86. SAGPyA - SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2002. [www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar).
87. SANOGO, S.; YANG, X. B. and SCHERM, H. 2000. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. *Phytopathology* 90:57-66.
88. SEZGIN, E. 1978. Investigations on the effects of some herbicides on the growth and virulence of *R. solani*. and *T. viride*. *J. Turkish Phytopath.* 7:(2-3) 105-112.
89. SIGMA CATALOGUE. 1994. Plant cell culture technical information. Pg. 97.

90. SINGH, D. and KAPOOR, A. S. 1996. Effects of fungicides on various growth stages of *S. sclerotiorum*. Indian J. Mycol. Plant Pathol. 26:185-189.
91. STELLA, E. C. 1995. Preparación y fertilización para soja maíz y girasol. Revista Supercampo N°10. Editorial Perfil. Buenos Aires. Argentina Pg 16.
92. TANRIKUT, S. and VAUGHAN, E. 1951. Studies on the physiology of *S. sclerotiorum*. Phytopathology 41:1099-1103.
93. TEASDALE, J. R.; HARVEY, R. G. and HAGEDORN, D. J. 1978. Suppression of pea (*Pisum sativum*) root rot by dinitroaniline herbicides. Weed Science 26:609-613.
94. THAKUR, R. P. and MUKHOPADHYAY, A. N. 1972. Nitrogen fertilization of sugarbeet in relation to sclerotium root rot caused by *S. rolfsii* Sacc. Indian J. Agric. Sci. 42:614-617.
95. TRONSMO, A. 1989. Effect of fungicides and insecticides on growth of *Botrytis cinerea*, *T. viride* and *T. harzianum*. Norwegian Journal of Agricultural Sciences. 3:151-156.
96. TSAO, P. H. and OSTER, J. J. 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. Phytopathology 71:53-59.
97. VIJI, G.; MANIBHUSHANRAO, K. and BABY, U. I. 1997. Non-target effect of systemic fungicides on antagonistic microflora of *R. solani*. Indian Phytopath. 50:324-328.
98. VISCHETTI, C.; CASUCCI, C. and PERUCCI, P. 2002. Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation.  
[www.link.springer.de/link/service/journals/00374/contents/01/00433/paper](http://www.link.springer.de/link/service/journals/00374/contents/01/00433/paper)
99. WANG, S. C. and LE TOURNEAU, D. 1972. Aminoacids as nitrogen sources for growth and sclerotium formation in *S. sclerotiorum*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 59:509-512.
100. WARE, G. W. 1980. Effects of pesticides on non-target organism. Residue Reviews 76:173-201.
101. WILCOX, W. F. 1996. Influence of dinitroaniline herbicides on growth, sporulation and infectivity of four *Phytophthora* sp. pathogenic to deciduous fruit trees. Phytopathology 86:906-913.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Ing. Agr. Guillermo March, Director de mi tesis, quien guió mi aprendizaje con generosidad, dedicación, criterio realista y riqueza de conocimientos.
- Al Ing. Agr. Eloy Mateo Sagasta-Azpeitia, Titular de la Cátedra de Patología Vegetal de la E. T. S. I. Agrónomos de Madrid, quien desinteresadamente y con total espíritu docente me abrió las puertas hacia la Patología Vegetal, brindándome las “primeras armas” para desempeñarme en este área.
- Al Ing. Agr. Fernando Nome, Director del IFFIVE durante la realización de mi tesis, quien con silencioso y constante apoyo observó la trayectoria de mi Carrera desde la etapa de estudiante.
- A mi madre y hermanos quienes me dieron las “herramientas” necesarias para poder crecer profesionalmente sin olvidar lo más valioso de la vida: amor y honestidad.
- A mi querida amiga Laura Otero, quien con una sonrisa nunca escatimó en buenas palabras, apoyando mis decisiones más importantes y compartiendo largas charlas de colegas y amigas.
- A mis incondicionales amigas y compañeras de trabajo Cecilia Arias, Silvina Vargas, y Natalia Meneguzzi con quienes compartimos horas de alegría o tristeza con igual cariño.
- A Walter Arce quien me ayudó tomando meticulosamente las mediciones durante cada fin de semana.
- A todos mis queridos compañeros del IFFIVE, con quienes considero formamos una gran familia.
- A nuestro compañero Alejandro Lopez que desde el cielo seguro puede ver que forma parte de esta gran familia.