



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencia, Tecnología e Innovación
Agropecuaria

**CONTROL DE LA VIRUELA TARDÍA DEL MANÍ CAUSADA POR
Nothopassalora personata MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
MICROORGANISMOS SOLOS O COMBINADOS CON FUNGICIDAS**

Ing. Agr. Damián Francisco Giordano

DIRECTORA: Dra. Adriana Mabel Torres

CODIRECTOR: MSc. Claudio Marcelo Oddino

CODIRECTORA EXTERNA: Irene da Silva Coelho

Río Cuarto, Julio 2022

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido Lugar de trabajo

Firma Aclaración

Nombre y Apellido Lugar de trabajo

Firma Aclaración

Nombre y Apellido Lugar de trabajo

Firma Aclaración

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha

Calificación

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mamá, papá y hermana, por ser mi pilar más importante, por el cariño que me han brindado siempre y por apoyarme incondicionalmente en cualquier decisión que tome, y mi sobrinito, Santi, por recordarme constantemente lo importante que es disfrutar de las cosas simples de la vida.

A mis amigos, que me han acompañado en este proceso, siendo otro eslabón fundamental, presentes en mis momentos de alegría y principalmente en aquellos de catarsis.

A mis directores, Adriana y Claudio, de los que he aprendido mucho en el transcurso de estos más de cinco años, tanto en lo estrictamente vinculado al doctorado como en otros aspectos de la vida académica, científica, y sobretodo personal, por su hermosa calidad humana. También agradezco a Irene, mi codirectora en la UFRRJ, quién fue mi tutora en dicha universidad, facilitó el trabajo en EMBRAPA y me acogió muy cálidamente desde el primer hasta el último día en Brasil.

A mis compañeros, colegas y amigos en la UNRC que me ayudaron durante todo el proceso; de todos aprendí algo y espero haber correspondido de la mejor manera.

A la comisión evaluadora de mi tesis, que han aportado mucho a su desarrollo a través de sus comentarios, sugerencias y críticas constructivas, mediante los dictámenes, devolución de informes escritos y oral, incluso personalmente, siempre con un gran respeto.

A la UNRC, por brindarme el espacio para realizar mi formación de grado y ahora de posgrado, tanto para ejecutar mis ensayos, como para tomar cursos generales y específicos a mi temática, al igual que a los integrantes de la junta académica y secretaría de posgrado que han cumplido con sus respectivas tareas y han resuelto mis solicitudes cada vez que lo necesité.

A Criadero El Carmen, por brindarme semillas de maní y el espacio físico para realizar mis ensayos de campo.

A CONICET, que me otorgó la beca interna para la realización de mi doctorado.

A los organismos a través de los cuales dispusimos de fondos para la realización de mis actividades de investigación y formación académica: Secretaría de Ciencia y Técnica, UNRC (PPI 2016-2019 y 2019-2022); CONICET (PIP 11220170100718CO 2017-2019); Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (PICT-2018-04057, 2019-2022 – PICT-2017-2740, 2018-2022)); Ministerio de Ciencia y Tecnología (PID 2019-2021).

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
RESUMO	xv
I. INTRODUCCIÓN	
1. Maní.....	2
1.1. Generalidades	2
1.2. Origen.....	2
1.3. Composición	3
1.4. Morfología.....	3
1.5. Fisiología.....	4
1.6. Fenología.....	5
2. Enfermedades del maní	5
2.1. Viruela del maní.....	6
2.1.1. Agente causal	6
2.1.2. Síntomas y ciclo de la enfermedad.....	7
2.1.3. Control químico.....	9
3. Control biológico de patógenos	12
3.1. Antecedentes en maní.....	12
3.2. Genero <i>Trichoderma</i>	13
3.3. Genero <i>Pseudomonas</i>	18
4. <i>Trichoderma</i> , <i>Pseudomonas</i> y fungicidas químicos.....	19
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
1. Hipótesis	22
2. Objetivos.....	22
2.1. Objetivo general	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
III. METODOLOGÍA GENERAL	
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1.1. Cultivar y curado de semillas	24
1.2. Preparación del inóculo de los ACB	25
1.2.1. Cepa fúngica.....	25
1.2.2. Cepa bacteriana.....	26

1.3. Inoculación de semillas	26
1.3.1. Recuento de conidios a partir de semillas inoculadas	27
1.4. Evaluación del poder germinativo de las semillas tratadas	27
1.5. Evaluación de la técnica de inoculación a las semillas, observación en microscopio electrónico de barrido.....	29
1.6. Análisis estadístico.....	31
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
2.1. Efecto de fungicidas curasemillas sobre <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636.....	32
2.2. Evaluación del poder germinativo de las semillas tratadas.....	33
2.3. Observación en microscopio electrónico de barrido	34
IV. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.1. Primer ensayo de invernadero: 2017/18.....	39
1.2. Segundo ensayo de invernadero: 2018/19.....	41
1.3. Tercer ensayo de invernadero: 2019/20	44
1.4. Cuarto ensayo de invernadero: 2020/21	45
2. RESULTADOS	48
2.1. Primer ensayo de invernadero: 2017/18.....	48
2.2. Segundo ensayo de invernadero: 2018/19.....	50
2.3. Tercer ensayo de invernadero: 2019/20	53
2.4. Cuarto ensayo de invernadero: 2020/21	54
3. DISCUSIÓN.....	57
V. OBJETIVO ESPECÍFICO 2	
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1.1. Determinación de actividad β -1,3-glucanasa	62
1.2. Determinación de actividad quitinasa	63
1.3. Determinación de actividad polifenoloxidasa	64
2. RESULTADOS	65
2.1. Actividad enzimática β -1,3-glucanasa	65
2.2. Actividad enzimática quitinasa	66
2.3. Actividad enzimática polifenoloxidasa	67
3. DISCUSIÓN.....	68
VI. OBJETIVO ESPECÍFICO 3	
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
2. RESULTADOS	76
3. DISCUSIÓN.....	81

VII. OBJETIVO ESPECÍFICO 4	
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
1.1. Diseño de los ensayos y tratamientos.....	84
1.2. Variables evaluadas.....	87
1.2.1. Ensayos de campo campaña 2017/18.....	87
1.2.2. Ensayos de campo campaña 2018/19.....	88
1.2.3. Ensayos de campo campaña 2019/20.....	89
2. RESULTADOS	90
2.1. Ensayos de campo campaña 2017/18.....	90
2.1.1. General Cabrera.....	90
2.1.2. Vicuña Mackenna.....	91
2.2. Ensayos de campo campaña 2018/19.....	92
2.2.1. General Cabrera.....	93
2.2.2. Vicuña Mackenna.....	97
2.3. Ensayos de campo campaña 2019/20.....	100
2.3.1. General Cabrera.....	100
2.3.2. Vicuña Mackenna.....	102
3. DISCUSIÓN.....	107
VIII. CONCLUSIONES.....	114
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	118
X. ANEXOS	
X.1. Metodología General	134
X.1.1. Medios de cultivo utilizados.....	134
X.1.2. Análisis de la varianza - poder germinativo	134
X.2. Ensayos de invernadero	134
X.2.1. Análisis de la varianza - ensayo 2017/18	134
X.2.2. Análisis de la varianza - ensayo 2018/19	138
X.2.3. Análisis de la varianza - ensayo 2019/20	141
X.2.4. Análisis de la varianza - ensayo 2020/21	142
X.3. Determinación de actividad enzimática.....	143
X.3.1. Soluciones empleadas.....	143
X.3.2. Determinación de actividad β -1,3-glucanasa	145
X.3.2.1. Pasos para obtener unidades de actividad enzimática β -1,3-glucanasa.....	146
X.3.3. Determinación de actividad quitinasa	146
X.3.3.1. Pasos para obtener unidades de actividad enzimática quitinasa.....	146

X.3.4. Análisis de la varianza – actividades enzimática	147
X.3.4.1. Actividad β -1,3-glucanasa.....	147
X.3.4.2. Actividad quitinasa.....	148
X.3.4.3. Actividad PPO.....	149
X.4. Soluciones usadas para la fijación y tinción de raíces para observación en microscopio confocal	150
X.5. Análisis de la varianza - ensayos de campo.....	151
X.5.1. General Cabrera campaña 2017/18	151
X.5.2. Vicuña Mackenna campaña 2017/18.....	153
X.5.3. General Cabrera campaña 2018/19	154
X.5.4. Vicuña Mackenna campaña 2018/19.....	157
X.5.5. General Cabrera campaña 2019/20	159
X.5.6. Vicuña Mackenna campaña 2019/20.....	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fungicidas registrados para viruela del maní	10
Tabla 2: Parámetros evaluados a los 10 días después de la siembra en arena, según tratamiento realizado a las semillas de maní	33
Tabla 3: Emergencia de plantas de maní sometidas a aplicación de bioformulados en la semilla, ensayo invernadero 2017/18	48
Tabla 4: Parámetros de crecimiento de las plantas de maní según tratamiento a la semilla con los diferentes bioformulados, ensayo invernadero 2017/18	48
Tabla 5: Rendimiento de maní en vainas, granos y granos calidad confitería según el tratamiento a las semillas con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2017/18	50
Tabla 6: Emergencia de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2018/19	50
Tabla 7: Parámetros de crecimiento de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2018/19	51
Tabla 8: Rendimiento de maní en vainas, granos y granos calidad confitería según el tratamiento con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2018/19	53
Tabla 9: Emergencia de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2019-2020	53
Tabla 10: Emergencia de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2020/21	54
Tabla 11: Rendimiento de maní en vainas, granos y granos calidad confitería según el tratamiento con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2020/21	56
Tabla 12: Actividad enzimática β -1,3-glucanasa en folíolos de maní según tratamiento con los diferentes bioformulados e inoculación con <i>N. personata</i>	65
Tabla 13: Actividad enzimática quitinasa en folíolos de maní según tratamiento con los	

diferentes bioformulados e inoculación con <i>N. personata</i>	66
Tabla 14: Cambios de actividad enzimática PPO en folíolos de maní según tratamiento con los diferentes bioformulados e inoculación con <i>N. personata</i>	67
Tabla 15: Especificaciones de los lugares y condiciones donde se ejecutaron los ensayos a campo	84
Tabla 16: Principios activos de los fungicidas, dosis utilizadas y número de aplicaciones	85
Tabla 17: Rendimientos de maní (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. General Cabrera campaña 2017/18	91
Tabla 18: Rendimientos de maní (kg/ha ± error estándar) según fungicidas. General Cabrera campaña 2017/18	91
Tabla 19: Rendimientos de maní (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2017/18	92
Tabla 20: Rendimientos de maní (kg/ha ± error estándar) según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2017/18	92
Tabla 21: Intensidad de viruela tardía del maní (<i>N. personata</i>) según curasemillas. General Cabrera campaña 2018/19	93
Tabla 22: Rendimientos (kg/ha ± error estándar) según fungicidas. General Cabrera campaña 2018/19.....	96
Tabla 23: Rendimientos (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. General Cabrera campaña 2018/19.....	96
Tabla 24: Intensidad de viruela tardía del maní (<i>N. personata</i>) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2018/19	97
Tabla 25: Rendimientos (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2018/19.....	99
Tabla 26: Rendimientos (kg/ha ± error estándar) según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2018/19.....	99
Tabla 27: Intensidad de viruela tardía del maní (<i>N. personata</i>) según curasemillas. General Cabrera campaña 2019/20	100
Tabla 28: Intensidad de viruela tardía del maní (<i>N. personata</i>) según fungicidas. General Cabrera campaña 2019/20	101
Tabla 29: Rendimientos estimados (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. General Cabrera campaña 2019/20	102
Tabla 30: Rendimientos estimados (kg/ha ± error estándar) según fungicidas. General Cabrera campaña 2019/20	102
Tabla 31: Intensidad de viruela tardía según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20	103
Tabla 32: Intensidad de la viruela tardía según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20	104
Tabla 33: Rendimientos estimados (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20	104
Tabla 34: Rendimientos estimados (kg/ha ± error estándar) según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20	105

Tabla 35: Medidas de resumen de la intensidad de la enfermedad a nivel de ensayo.....	105
Tabla 36: Medidas de resumen de los rendimientos (kg/ha \pm error estándar) a nivel de ensayo	106
Tabla A1: Muestras empleadas para medir absorbancia y obtener curva estándar de glucosa	145
Tabla A2: Valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de glucosa.....	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Conidióforos y conidios de <i>Nothopassalora personata</i> , observados en microscopio óptico, 40X	7
Figura 2: Síntomas de viruela tardía.....	8
Figura 3: Colocación de semillas en recipiente con arena para evaluar PG.....	28
Figura 4: Observación 10 DDS	28
Figura 5: Plántulas de 10 días normales y vigorosas.....	29
Figura 6: Suspensión filtrada de conidios de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 para su observación en microscopio electrónico de barrido.	29
Figura 7: Microscopio electrónico de barrido, EMBRAPA Agrobiología, Rio de Janeiro, Brasil.....	29
Figura 8: Cortes y montaje de semillas para su observación en microscopio electrónico de barrido.....	30
Figura 9: Corte y visualización de tegumento de semilla de maní para estimación de su superficie	31
Figura 10: Placas de DRBC sembradas a partir de semillas curadas e inoculadas con <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636	32
Figura 11: Imagen de microscopio electrónico de barrido con 1,23 K de aumento. Suspensión de conidios de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 sobre filtro 0,22 μ m.....	34
Figura 12: Imagen de microscopio electrónico de barrido con 4,16 K de aumento. Suspensión de conidios de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 sobre filtro de 0,22 μ m.....	35
Figura 13: Imagen de microscopio electrónico de barrido con 9,07 K de aumento. Suspensión de conidios de <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 sobre filtro de 0,22 μ m.....	35
Figura 14: Imagen de microscopio electrónico de barrido. 1,21 K de aumento. Superficie de semilla de maní inoculada con <i>T. harzianum</i> ITEM 3636.....	36
Figura 15: Imagen de microscopio electrónico de barrido, procesada en el Programa Imagen J.....	37
Figura 16: Disposición de las macetas en el ensayo en invernadero 2017/18.....	40
Figura 17: Medición de parámetros de crecimiento	41
Figura 18: Obtención de conidios de <i>Nothopassalora personata</i> desde hojas de maní enfermas.....	42

Figura 19: Disposición de las macetas en el ensayo en invernadero 2018/19.....	43
Figura 20: Escala diagramática de severidad de viruela del maní propuesta por Shokes <i>et al.</i> (1987)	44
Figura 21: Disposición de las macetas en el ensayo en invernadero 2019/20.....	45
Figura 22: Disposición de macetas en ensayo en invernadero 2020/21	46
Figura 23: Variables de crecimiento de plantas de maní según el tratamiento a la semilla con los diferentes bioformulados, ensayo invernadero 2017-2018	49
Figura 24: Variables de crecimiento de plantas de maní según el tratamiento a la semilla con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2018-2019	51
Figura 25: Intensidad de viruela tardía (<i>Nothopassalora personata</i>), según los tratamientos realizados con bioformulados, ensayo de invernadero 2018/19.....	52
Figura 26: Número de folíolos enfermos por maceta según tratamiento con bioformulados, ensayo de invernadero 2020-2021	55
Figura 27: Incidencia de viruela tardía según tratamiento con bioformulados, ensayo de invernadero 2020-2021	55
Figura 28: Severidad de viruela tardía según tratamiento con bioformulados, ensayo de invernadero 2020-2021	56
Figura 29: Actividad enzimática β -1,3-glucanasa en folíolos de maní según los tratamientos con bioformulados e inoculación con <i>N. personata</i>	65
Figura 30: Actividad enzimática quitinasa en folíolos de maní según los tratamientos con bioformulados e inoculación con <i>N. personata</i>	66
Figura 31: Actividad enzimática PPO en folíolos de maní según los tratamientos con bioformulados e inoculación con <i>N. personata</i>	67
Figura 32: Acondicionamiento de semillas de maní	74
Figura 33: Procesamiento de muestras y fijación de tejido para su posterior tinción	75
Figura 34: Tinción de muestras y observación en microscopio confocal.....	75
Figura 35: Corte longitudinal y transversal de raíces de maní, a partir de semillas sin inocular. Imagen 10X.	76
Figura 36: Corte longitudinal de raíz de maní, a partir de semillas tratadas con <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636. Imagen 10X	77
Figura 37: Vista en 3D construida desde corte longitudinal de raíz, a partir de semillas tratadas con <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636, mostrando colonización de las células de la corteza.....	78
Figura 38: Imagen ortogonal de un corte longitudinal de raíz de maní, a partir de semillas tratadas con <i>Trichoderma harzianum</i> ITEM 3636. Imagen 63X	78
Figura 39: Imágenes ortogonales de corte longitudinal de tejido radical de maní, a partir de semillas tratadas con <i>T. harzianum</i> ITEM 3636. Imágenes 63X	79
Figura 40: Corte longitudinal de raíz de maní, a partir de semillas tratadas con <i>T. harzianum</i> ITEM 3636 con luz transmitida más fluorescencia verde y roja. Imagen 63X.	80
Figura 41: Imagen construida a partir de corte longitudinal de raíz de maní, semilla tratada con <i>T. harzianum</i> ITEM 3636, con señales verde y rojo fluorescentes.....	80
Figura 42: Suspensiones para inoculación de semillas	85

Figura 43: Diseño en franjas de los ensayos a campo	86
Figura 44: Ensayo de campo correspondiente a la campaña 2018-2019.....	87
Figura 45: Ramas laterales y evaluación de viruela mediante escala diagramática	89
Figura 46: Lotes de maní correspondientes a los ensayos de campo de la campaña 2019/20, Vicuña Mackenna y General Cabrera.....	89
Figura 47: Incidencia final de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19.....	94
Figura 48: Severidad final de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19.....	94
Figura 49: Tasa de incremento de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19	95
Figura 50: Área bajo la curva de progreso de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19.....	95
Figura 51: Incidencia de viruela tardía del maní según fungicidas. Vicuña Mackenna, campaña 2018/19.....	98
Figura 52: Severidad de viruela tardía del maní según fungicidas. Vicuña Mackenna, campaña 2018/19.....	98
Figura A1: Curva estándar de glucosa.....	145
Figura A2: Curva estándar de N-acetilglucosamina.....	146

RESUMEN

Argentina se posiciona entre los principales productores y exportadores de maní (*Arachis hypogaea* L.), la mayor parte de la producción se desarrolla en la provincia de Córdoba, aunque el cultivo se ha ido desplazando debido principalmente a las enfermedades fúngicas que afectan su producción. La viruela tardía (*Nothopassalora personata*), es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, con pérdidas que pueden ser elevadas bajo condiciones ambientales favorables y falta de medidas de manejo adecuadas. La principal herramienta para su control es la aplicación de fungicidas, sin embargo se han encontrado escapes de la enfermedad, posiblemente por el surgimiento de subpoblaciones del patógeno resistentes a ciertos principios activos, a lo que se suma la mayor presión social y de los países importadores por reducir el uso de pesticidas y apuntar hacia un manejo integrado. Dentro de este esquema, el control biológico es una herramienta con gran potencial, que se viene estudiando fuertemente en diferentes patosistemas. Con el objetivo de aportar herramientas para el manejo integrado de la enfermedad, se estudiaron las cepas *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 y *Pseudomonas putida* RC-93 y la aplicación de fungicidas químicos. En ensayos de laboratorio y mediante microscopía electrónica, se evaluó la aplicación de ITEM 3636 a las semillas, y su comportamiento luego de la germinación, mediante microscopía confocal. Se llevaron a cabo ensayos de invernadero para estudiar el efecto de la aplicación de ambas cepas en la emergencia, crecimiento y producción de las plantas, sobre la intensidad de viruela tardía y posibles cambios en enzimas relacionadas con la inducción de defensas. Finalmente, en ensayos a campo, se evaluó el efecto de estos microorganismos inoculados en las semillas y la aplicación foliar de fungicidas, frente a la enfermedad y su impacto en el rendimiento. La aplicación de ITEM 3636 a las semillas, fue compatible con el uso de fungicidas curasemillas y el adherente utilizado permitió su correcta dispersión; a su vez, se pudo comprobar su comportamiento como endófito de las raíces de maní. Ninguna de las cepas generó problemas en la emergencia y RC-93 logró un mayor crecimiento de las raíces en condiciones de invernadero, donde ambas cepas disminuyeron la intensidad de la enfermedad, sin encontrar diferencias en la actividad enzimática evaluada. A campo, la enfermedad disminuyó solamente con los fungicidas, entre los que resaltó la aplicación de clorotalonil y una mezcla que contenía una carboxamida; en cuanto al rendimiento, sólo se observó mayor producción de granos calidad confitería con la aplicación de ITEM 3636 en dos ensayos respecto al testigo. Estas cepas representan una potencial herramienta para

incluir dentro de un programa de manejo integrado de viruela tardía del maní, es importante continuar con la investigación para encontrar la mejor forma de aplicación y descifrar los mecanismos involucrados en el biocontrol.

ABSTRACT

Argentina is one of the main peanuts (*Arachis hypogaea* L.) producing and exporting countries, the major production of this crop takes place in Cordoba province. Lately the production area has migrated mainly because of the peanut fungal diseases. Late leaf spot (*Nothopassalora personata*) is one of the most important diseases worldwide, reaching high yield losses under favorable weather conditions and lack of proper management measures. The main tool for its control is the application of fungicides, however it has been observed that this tool can lose its effectiveness, possibly due to the emergence of fungal subpopulations which are resistant to certain active ingredients. In addition to this, there is a high pressure from society and the peanut importing countries to reduce the use of pesticides and to aim towards a integrated disease management. In this approach, biological control is a tool with big potential, which has been studied hardly in different pathosystems. With the goal of contributing with some integrated management tools for this disease, the isolates *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 and *Pseudomonas putida* RC-93 and the application of chemical fungicides were studied. In laboratory assays and through electron microscopy, it was tested the application of ITEM 3636 on seeds and its behavior after germination, by means of laser scanning confocal microscopy. Experiments in greenhouse were carried out in order to study the effect of the application of both isolates on the plant emergency, growth and production, late leaf spot intensity and possible changes in the activity of enzymes related with defense induction. Finally, the effect on the disease and the impact on crop yield of the microorganisms application on seeds and fungicides foliar application were evaluated through field assays. The application of ITEM 3636 on seeds were compatible with the use of chemical fungicides on it and the adherent used allowed a correct dispersion; furthermore, the behavior of the isolate as endophyte in peanut roots was confirmed. None of the isolates caused problems on peanut emergency, and RC-93 achieved a bigger root growth under greenhouse conditions. Both isolates were able to decrease the disease intensity, but no differences on the enzymatic activity were found. On field tests, the disease only decreased with the use of fungicides, standing out chlorothalonil and a mixture that contained a carboxamide; regarding the yield, a greater production of confectionary quality grains was obtained only with the application of ITEM 3636 in two assays when comparing with the control. These isolates represent a potential tool to be included in an integrated management program of

peanut late leaf spot, it is important to continue the research in order to find the best application form and to decipher the mechanisms involved in the biocontrol.

RESUMO

A Argentina está entre os principais produtores e exportadores de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), a maior parte da produção está localizada na província de Córdoba, embora a cultura tenha migrado principalmente devido a doenças fúngicas que afetam sua produção. A mancha preta do amendoim (*Nothopassalora personata*), é uma das doenças mais importantes a nível mundial, com perdas que podem ser elevadas em condições ambientais favoráveis e na falta de medidas adequadas. A principal ferramenta para o seu controle é a aplicação de fungicidas, porém sua eficiência pode sofrer redução, possivelmente devido ao surgimento de subpopulações de patógenos resistentes a determinados princípios ativos, além da maior pressão social e dos países importadores para reduzir o uso de pesticidas e visando o manejo integrado. Nesse contexto, o controle biológico é uma ferramenta com grande potencial, que vem sendo bastante estudada em diferentes patossistemas. Com o objetivo de fornecer ferramentas para o manejo integrado da doença, foram estudadas as cepas *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 e *Pseudomonas putida* RC-93 e a aplicação de fungicidas químicos. Em testes de laboratório e por microscopia eletrônica, a aplicação da ITEM 3636 nas sementes, e seu comportamento após a germinação, foi avaliada por microscopia confocal. Testes em estufa foram realizados para estudar o efeito da aplicação de ambas as linhagens na emergência, crescimento e produção das plantas, na intensidade da mancha preta e possíveis alterações nas enzimas relacionadas à indução de defesas. Por fim, em ensaios de campo, avaliou-se o efeito desses microrganismos inoculados nas sementes e a aplicação foliar de fungicidas contra a doença e seu impacto na produtividade. A aplicação da ITEM 3636 nas sementes foi compatível com o uso de fungicidas de tratamento de sementes e o aderente utilizado permitiu sua correta dispersão; além disso, verificou-se seu comportamento como endófito de raízes de amendoim. Nenhuma das linhagens gerou redução na emergência e a RC-93 obteve maior crescimento radicular em estufa, onde ambas as linhagens diminuíram a intensidade da doença, sem observar diferenças na atividade enzimática avaliada. Em campo, a doença foi reduzida apenas com a utilização de fungicidas, entre os quais se destacou a aplicação de clorotalonil e uma mistura contendo uma carboxamida. Em termos de produtividade, uma maior produção de grãos de qualidade para confeitaria só foi observada com a aplicação da ITEM 3636 em dois ensaios em relação ao controle. Essas cepas representam uma potencial ferramenta a ser incluída em um programa de manejo integrado da mancha preta do amendoim. Por este motivo, é importante continuar com as

pesquisas para encontrar a melhor forma de aplicação e decifrar os mecanismos envolvidos no biocontrole dessa doença.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Maní

1.1. Generalidades

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es una especie alotetraploide ($2n = 40$), ampliamente cultivada en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. En la última década su producción mundial se ha mantenido alrededor de los 45 millones de toneladas. El principal producto comercializado a nivel mundial, es el maní sin cáscara, teniendo como los principales exportadores a India, Estados Unidos, Argentina, Brasil y China, con un 85% del total comercializado, correspondiendo el 29% de las importaciones a la Unión Europea. El segundo producto en importancia para el sector, es el maní preparado o en conserva, que tiene a Argentina como el primer exportador (42% del total de las exportaciones a nivel mundial), donde Estados Unidos nuclea el 11,4% de las compras, seguido por Japón, Corea y Canadá. Respecto al aceite de maní, China es un importante consumidor cuyo principal proveedor es Argentina, que se consolida como el mayor exportador con 44% del volumen total (Calzada y Rozadilla, 2018).

Actualmente, Argentina se posiciona como el octavo productor de maní a nivel mundial; a su vez, debido a la reconocida calidad del maní argentino y al bajo consumo interno (alrededor de 400 gr anuales per cápita), el país ocupa el primer lugar como exportador de aceite y maní calidad confitería (USDA, 2021). Dentro de Argentina, la provincia de Córdoba ocupa el primer lugar en superficie y producción de este cultivo, y abarca la totalidad de su proceso de industrialización, generando más de 12.000 puestos de trabajo en diferentes localidades (CAM, 2021). Sin embargo, en las últimas dos décadas, se ha registrado un fuerte desplazamiento del cultivo hacia los departamentos del sur de Córdoba, incluso a provincias limítrofes (MAGyP, 2021).

1.2. Origen

Hay datos que muestran que los maníes se desplazaron al Valle de Zaña en el norte de Perú 8.500 años atrás, probablemente desde el este de las montañas de Los Andes, pero con características muy diferentes a las del actual maní domesticado (Dillehay *et al.*, 2007). Los primeros exploradores españoles y portugueses, hallaron cultivos de maní en varias islas del oeste de la India, en México, costas noreste y este de Brasil, en toda la cuenca

cálida del Río de La Plata y de manera extensiva en Perú. Desde allí se fue diseminando a Europa, África, Asia, e incluso las Islas del Pacífico y luego viajó al territorio sudeste de los Estados Unidos (Hammons *et al.*, 2016). Las especies silvestres se encuentran sólo en Sudamérica, distribuidas desde el nordeste de Brasil al noroeste de Argentina y de la costa sur de Uruguay al noroeste del Mato Grosso, sur del Amazonas y de la base este de Los Andes hasta el Atlántico (Krapovickas y Gregory, 1994).

El maní cultivado, pertenece al Orden Fabales, Familia Fabaceae, subfamilia Papilionoidea, tribu Aeschynomeneae y proviene de la región noroeste andina de Argentina y Bolivia. En Argentina, su producción a pequeña escala comenzó en la época colonial, básicamente en Jujuy, Salta, Corrientes, Misiones, Chaco y norte de Santa Fe (García, 2005), siendo actualmente cultivado en la provincia de Córdoba (más del 80%), y en menor medida, en Buenos Aires, La Pampa y San Luis (MAGyP, 2021).

1.3. Composición

El maní es producido y comercializado para la industria aceitera (producción de aceite y pellets) y para el consumo humano directo. El grano contiene aproximadamente 40% de aceite, con alto contenido de ácido graso oleico, que le permite una larga vida en estante. La harina de maní, también constituye una importante demanda internacional para la producción de alimentos balanceados, debido a su alto contenido proteico. No obstante, casi el 50% del volumen total producido es exportado como maní confitería para el consumo humano directo. Entre sus propiedades, resaltan el aporte de gran variedad de antioxidantes, vitaminas A, C y E, polifenoles, ácido fólico, magnesio, hierro, grasas monoinsaturadas e incluso fibra (Bishi *et al.*, 2015), además de flavonoides, isoflavonas como el ácido p-cumárico y resveratrol (Francisco y Resurrección, 2008). Su consumo contribuye a la reducción de los niveles de lípidos y presión sanguínea, previniendo enfermedades cardiovasculares (Lopes *et al.*, 2011), puede proteger contra el Alzheimer, gracias a los efectos antiinflamatorios que se le atribuyen (Higgs, 2003), entre otros tantos beneficios que se asocian al consumo de sus granos (Arya *et al.*, 2016).

1.4. Morfología

Con el cambio del destino de la producción, de aceite comestible a granos para consumo directo, hubo un cambio en las variedades sembradas, pasando de las tipo Valencia y

Español (subespecie *fastigiata*), con un porte erecto y ciclo más corto (120 días) al tipo *Runner*, más ampliamente sembrado en la actualidad (subespecie *hypogaea* var. *hypogaea*), que posee un porte rastrero y ciclo de crecimiento más prolongado (160 días) (Baldessari, 2017).

El maní, es una planta herbácea, anual, con una altura normalmente entre 30 y 50 cm, el tallo es angular y puede ser glabro o pubescente; sus hojas son tetrafoliadas, con folíolos oblongo – lanceolados y se disponen de manera alternada en el tallo principal y ramas secundarias, siendo cada hoja sostenida por una estípula parcialmente adnata. Sus flores están agrupadas comúnmente en número de tres en racimo, se ubican en las axilas de las hojas en las ramas laterales y en el tallo principal en los tipos de la subespecie *fastigiata* (Periasamy y Sampooram, 1984). Tiene un patrón de floración indeterminado y la fertilización de sus flores, por autofecundación, ocurre sobre el nivel del suelo, pero las vainas se desarrollan debajo de este, para lo cual genera una estructura denominada ginóforo, comúnmente llamada clavo, que lleva el embrión desde la superficie hacia el suelo para el posterior desarrollo del fruto y los granos en su interior (Smith, 1950). El fruto es una legumbre unilocular, denominada geocarpo, conocido como vaina o caja; contiene 2 a 5 semillas, o por aborto puede tener solo una. Normalmente las semillas poseen un tegumento rojizo, violáceo-oscuro o blanco (Bianco *et al.*, 2006).

1.5. Fisiología

El maní es una planta tropical, por lo que requiere un período de crecimiento con temperaturas altas, precipitaciones bien distribuidas durante su crecimiento, con al menos un total de 500 mm y abundante radiación. El rango óptimo de temperatura es 25-30°C para el período de crecimiento vegetativo (Prasad *et al.*, 2003) y 22-24°C para el período de crecimiento reproductivo (Ong, 1984), temperaturas superiores a 34°C disminuyen el número de clavos y vainas, tamaño de semillas y consecuentemente el rendimiento del cultivo (Ong, 1984; Prasad *et al.*, 2000).

Una vez sembrada, la semilla tolera sequías, e incluso inundaciones. Durante el período de crecimiento del cultivo, puede generar rendimiento con precipitaciones que acumulen sólo 300 mm, aunque para una producción de calidad comercial, estas deberían ser de al menos 500 mm. Por otro lado, los mejores suelos para su implantación, son los franco arenosos bien drenados, con un pH entre 6.0 y 6.5 (Andrés *et al.*, 2016).

Es una especie con un hábito de crecimiento marcadamente indeterminado, encontrando flores, clavos y frutos en formación al mismo tiempo que la planta continúa creciendo vegetativamente (Giayetto *et al.*, 2017), por lo que al momento de la cosecha, es común encontrar vainas y granos de diferente tamaño y grado de madurez (Lamb *et al.*, 2017). Durante gran parte del ciclo del cultivo, hay competencia entre órganos reproductivos y vegetativos en activo crecimiento, sin embargo, es una especie que se encuentra limitada en su rendimiento, por los destinos reproductivos (Haro *et al.*, 2013; Morla *et al.*, 2017). Respecto al fotoperíodo, es una especie de día neutro al momento de la iniciación floral, mientras que este tiene efecto en su desarrollo fenológico post floración, comportándose en ese período, como una especie de días cortos facultativa (Bagnall y King, 1991).

1.6. Fenología

Las etapas vegetativas (V) se determinan en base al número de nudos desarrollados en el tallo principal, comenzando con el nudo cotiledonar como cero, hasta el último nudo con una hoja tetrafoliada totalmente expandida. Por su parte, las etapas reproductivas son: R1 (comienzo de floración), R2 (comienzo de formación de clavos), R3 (comienzo de formación de vainas), R4 (vainas completas), R5 (comienzo de formación de semillas), R6 (semilla completa), R7 (comienzo de madurez), R8 (madurez de cosecha) y R9 (vainas sobremaduras). A nivel de cultivo, se considera que se llega a una determinada etapa fenológica, cuando el 50% de las plantas observadas tienen cierto número de nudos (etapa vegetativa), o una o más flores, clavos, vainas o semillas (etapa reproductiva) (Boote, 1982).

2. Enfermedades del maní

Las enfermedades son el principal problema para la producción de maní en todas las áreas donde se cultiva. Estas pueden afectar la parte aérea o subterránea de las plantas (Marinelli *et al.*, 2017). Dentro de las primeras, se encuentra la viruela temprana (*Passalora arachidicola* Hori), viruela tardía (*Nothopassalora personata* (Berk. & M.A. Curtis) U. Braun, C. Nakash, Videira & Crous) y roya (*Puccinia arachidis* Speg.) que son las más extendidas y destructivas a nivel mundial, con registros de hasta 70% de pérdidas de

rendimiento (Subrahmanyam *et al.*, 1984); siendo la viruela la enfermedad foliar con mayor importancia tanto en Argentina como en todos los demás países productores (Hasan *et al.*, 2014; Jordan *et al.*, 2017; Marinelli *et al.*, 2017; Pires Ribeiro y Heuert, 2019; Anco *et al.*, 2020a). Ambos patógenos causantes de la viruela, pueden presentarse juntos, incluso sobre el mismo folíolo, pero en las últimas campañas agrícolas en Argentina, *N. personata* ha sido prácticamente la única especie encontrada (Marinelli *et al.*, 2017; Oddino *et al.*, 2018), lo que también ha sido señalado en otros países (Fulmer, 2017). Por otro lado, las enfermedades por patógeno habitantes del suelo con importancia en Argentina, por las pérdidas que pueden llegar a generar, son: el carbón del maní (*Thecaphora frezii*), tizón (*Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor*), podredumbre parda de la raíz (*Fusarium solani*) y marchitamiento (*Sclerotium rolfsii*) (Andrés *et al.*, 2016).

2.1. Viruela del maní

2.1.1. Agente causal

Los agentes causales de la viruela temprana y tardía, pertenecen al filo Ascomycota, clase Dothideomycetes, orden Capnodiales (Videira *et al.*, 2017). La viruela temprana es generada por *Passalora arachidicola* Hori, que posee micelio septado, comienza con un desarrollo intercelular al principio de la infección y luego intracelular, produciendo poca cantidad de estroma color marrón oscuro, con conidióforos amarillo-amarronados, fasciculados, geniculados, que pueden ser septados o no. Por su parte, los conidios son hialinos a ligeramente color oliva, obclavados, con 4 a 13 septas, curvados, con 38-108 µm de longitud y 2-5 µm de ancho (Kolte, 1985).

Por su parte, la especie que produce la viruela tardía, es *Nothopassalora personata* (Berk. & M.A. Curtis) U. Braun, C. Nakash., Videira & Crous, y ha sufrido numerosos cambios de nombre a lo largo de los años, los sinónimos con los que se la puede encontrar en la bibliografía son: *Cladosporium personatum* Berk. & M.A. Curtis, (1875); *Cercospora personata* (Berk. & M.A. Curtis) (1885); *Septogloeum arachidis* (1898); *Cercospora arachidis* (1902); *Cercosporiopsis personata* (Berk. & M.A. Curtis) (1928); *Passalora personata* (Berk. & M.A. Curtis) (1961); *Cercosporidium personatum* (Berk. & M.A. Curtis) (1967); *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & M.A. Curtis) (1983) (Giordano *et al.*, 2021a). Su micelio es septado y exclusivamente intercelular; la infección es causada por los haustorios en el tejido de empalizada y en el mesófilo. El micelio crece dentro del

vegetal, alrededor de los puntos de infección, generando un estroma denso dentro de la epidermis, produce conidióforos fasciculados y geniculados, de color marrón rojizo, con puntas hialinas, con o sin septos (Figura 1). Los conidios son solitarios, de color marrón pálido a oliváceo, con paredes anchas, cilíndricos a obclavados, rectos o suavemente curvados, ápice redondeado o estrechándose en un pico, base redondeada levemente truncada, con una longitud de $38\text{--}85 \times 5\text{--}8 \mu\text{m}$, 2-7 septos y un ancho de $3\text{--}4 \mu\text{m}$ (Kolte, 1985; Videira *et al.*, 2017).

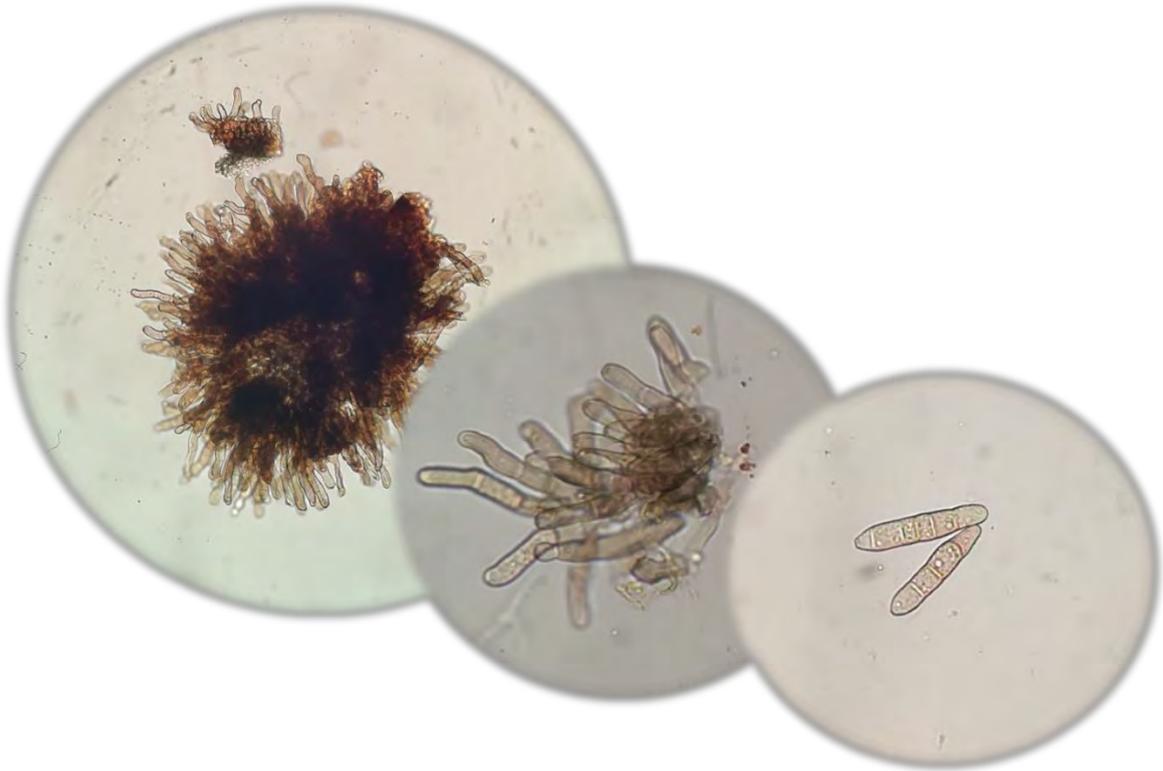


Figura 1: Conidióforos y conidios de *Nothopassalora personata*, observados en microscopio óptico, 40X.

Para el nombramiento de estos hongos, se ha tenido en cuenta lo impuesto en el marco del congreso internacional de botánica realizado en Melbourne (2011), donde se introdujeron una serie de cambios en la nomenclatura botánica para algas, hongos y plantas. Se abandonó el nombre dual, y el último código internacional de nomenclatura obliga a que cada especie sea denominada por un solo nombre.

2.1.2. Síntomas y ciclo de la enfermedad

Los síntomas principalmente se ven en los folíolos, pudiendo desarrollar un halo clorótico o no, también se pueden encontrar en pecíolos, tallos y clavos (Marinelli y March, 2005;

Gremillion *et al.*, 2011), comenzando por las hojas inferiores (Figura 2). En la cara abaxial del folíolo, la mancha por viruela tardía es marrón a negra, con una textura rugosa, mientras que la producida por viruela temprana es marrón clara y tiene textura suave (Marinelli *et al.*, 2017). Ambos patógenos pasan el invierno como micelio vegetativo en el rastrojo, luego, en primavera se estimula la conidiogénesis y los conidios se dispersan por acción de las precipitaciones y del viento, pudiendo causar las primeras infecciones. La patogénesis de *N. personata* comienza con el desarrollo del tubo germinativo que entra en las células vegetales a través de los estomas o directamente por la epidermis, permitiendo el crecimiento intercelular del micelio. Las lesiones se desarrollan 10-14 días luego de la infección inicial, donde aparecen las manchas en las que se producen los conidios, que al ser dispersados por lluvia y viento, generan infecciones secundarias. La humedad relativa, es el principal factor climático que desencadena la enfermedad, sumado a temperaturas entre 18 y 20°C, que son óptimas para la germinación de los conidios. El ciclo de la enfermedad, se puede repetir muchas veces durante el ciclo del cultivo si las condiciones ambientales son adecuadas (cinco o más horas con humedad relativa superior a 95% y temperaturas mayores a 16° C), a medida que aumenta la temperatura, se incrementa la tasa de desarrollo de la enfermedad (Marinelli y March, 2005).

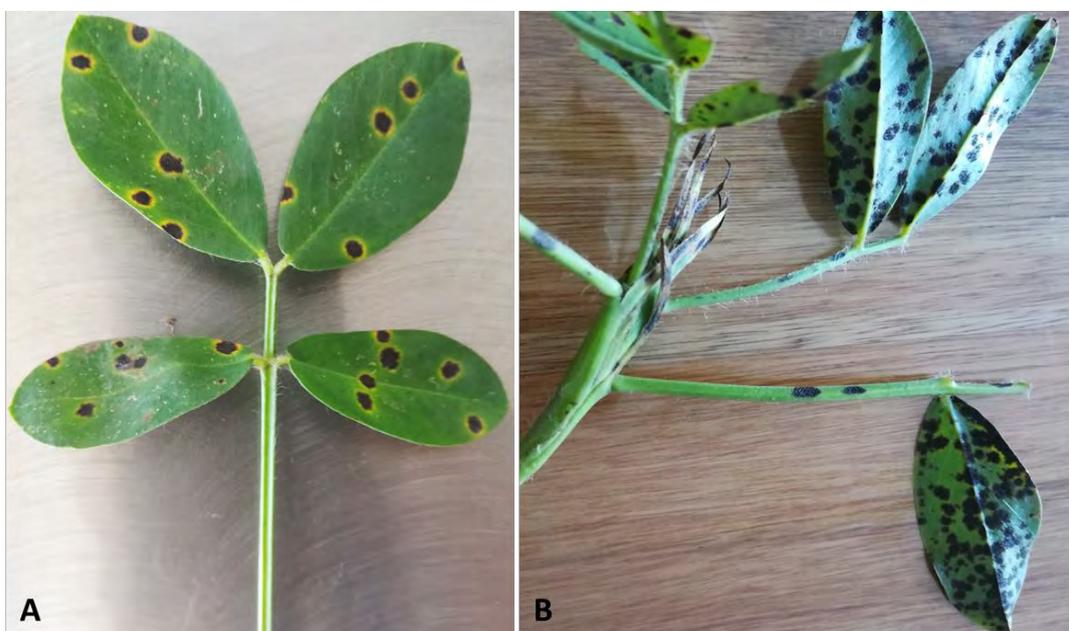


Figura 2: Síntomas de viruela tardía: manchas con halo clorótico en folíolos (A), manchas en folíolos, pecíolos y estípulas, y defoliación (B).

La viruela causa reducción en la asimilación de carbono, senescencia prematura de las hojas y desprendimiento de vainas, lo que genera pérdidas de rendimiento (Bourgeois y

Boote, 1992). La cantidad y calidad de la producción es muy afectada con defoliaciones superiores a 20-35% a cosecha, según el ciclo agrícola y el sistema productivo (Backman y Crawford, 1984; Nutter y Shokes 1995, Anco *et al.*, 2020a). El nivel de daño económico final para el área productora de la provincia de Córdoba, se ha calculado en 10-13% de severidad (Cappiello *et al.*, 2012). La defoliación ha sido indicada como la principal causa de las pérdidas de rendimiento (Backman y Crawford, 1984); a su vez, con altos valores de intensidad o una demora en el arrancado, los clavos se debilitan y se pierden vainas al momento de la cosecha (Bourgeois y Boote, 1992). La intensidad de esta enfermedad es muy variable según la localidad y campaña agrícola (Fulmer, 2017; Marinelli *et al.*, 2017; Oddino *et al.*, 2018).

2.1.3. Control químico

Al igual que sucede en otros patosistemas, para el manejo de esta enfermedad se recomiendan herramientas culturales, como realizar rotación de cultivos (Ijaz *et al.*, 2019), o no demorar la fecha de siembra (Fulmer, 2017; Jordan *et al.*, 2019). Sin embargo, por el elevado potencial del inóculo de generar infecciones, el manejo de esta enfermedad a campo, se realiza casi exclusivamente con el uso de fungicidas químicos (Jordan *et al.*, 2017). La principal táctica empleada ha sido la aplicación de fungicidas protectores de amplio espectro (de contacto), comenzando antes de evidenciar los primeros síntomas de la enfermedad (bajo condiciones ambientales predisponentes) y hasta tres semanas previas al arrancado. A su vez, se utilizan diversos fungicidas con un solo sitio de acción, lo que requiere cuidados, debido al elevado riesgo de generar resistencia a estos principios activos.

Actualmente, se cuenta con diversos productos (Tabla 1), que según su relación con el vegetal son clasificados como de contacto, sistémicos o mesostémicos. Los primeros forman una barrera química a la infección, actuando desde el momento en que son aplicados a la planta. Los sistémicos por su parte (principalmente el grupo químico de los triazoles), son absorbidos por los tejidos de las plantas, brindando una protección más uniforme (Siqueira de Acevedo, 2007). Los mesostémicos en cambio (estrobilurinas y carboxamidas), tienen un movimiento translaminar en los tejidos vegetales, lo que les otorga una mayor residualidad. Se recomienda iniciar las pulverizaciones inmediatamente una vez que se evidencien los primeros síntomas de la enfermedad, especialmente si las condiciones ambientales son predisponentes para su rápida diseminación. El intervalo entre

aplicaciones depende de las condiciones climáticas y de las características del fungicida, oscilando entre 14 y 21 días (Pedelini, 2016).

Tabla 1: Fungicidas registrados para viruela del maní

Principios activos	Relación con el vegetal	Grupo químico
Aceite de árbol del té + difenoconazole	S	Triazol
Azoxistrobina	S	Estrobilurina
Azoxistrobina + benzovindiflupir	M	Estrobilurina + carboxamida
Azoxistrobina + cyproconazole	M y S	Estrobilurina + triazol
Azoxistrobina + difenoconazole	M y S	Estrobilurina + triazol
Azoxistrobina + epoxiconazole	M y S	Estrobilurina + triazol
Benomil	S	Bencimidazol
Boscalid + pyraclostrobin	M	Carboxamida + estrobilurina
Carbendazim	S	Bencimidazol
Carbendazim + epoxiconazole	S	Bencimidazol + triazol
Clortalonil	P	Cloronitrilo
Cyproconazole	S	Triazol
Difenoconazole	S	Triazol
Difenoconazole + cyproconazole	S	Triazoles
Difenoconazole + propiconazole	S	Triazoles
Difenoconazole + pydiflumetofen	S y M	Triazol + carboxamida
Fluoxastrobin	M	Estrobilurina
Fluoxastrobin + tebuconazole	M y S	Estrobilurina + triazol
Flutriafol	S	Triazol
Fluxapyroxad + pyraclostrobin + epoxiconazole	M, M y S	Carboxamida + estrobilurina + triazol
Mancozeb	P	Ditiocarbamato
Metconazole + epoxiconazole	S	Triazoles
Picoxystrobin + cyproconazole	M y S	Estrobilurina + triazol
Picoxystrobin + pentiopirad	M	Estrobilurina + carboxamida
Prothioconazole + trifloxistrobin	S y M	Triazol + estrobilurina
Propiconazole	S	Triazol
Pyraclostrobin	M	Estrobilurina
Pyraclostrobin + epoxiconazole	M y S	Estrobilurina + triazol
Tebuconazole	S	Triazol
Tiofanato metil	S	Bencimidazol
Trifloxistrobin + ciproconazole	M y S	Estrobilurina + triazol

S: sistémico. M: mesostémico. P: protector. Fuente: CASAFE (2021).

Se ha reportado un mejor control de viruela con la aplicación de fungicidas del grupo de las carboxamidas, respecto a las mezclas de estrobilurinas y triazoles normalmente utilizadas, demostrando a su vez un efecto sinérgico frente a la enfermedad al combinar principios activos (Woelke *et al.*, 2014; Culbreath *et al.*, 2020).

En ensayos realizados en Argentina, se ha encontrado una buena eficiencia de control del fungicida multisitio clorotalonil (de contacto), al igual que con mezclas que contenían algún principio activo perteneciente a las carboxamidas, el grupo químico de más reciente incorporación en el sector maní (Oddino *et al.*, 2018; Giordano *et al.*, 2021b).

2.1.2.1. Resistencia a fungicidas

En ensayos *in vitro* realizados en Argentina se observó un comportamiento diferencial de *N. personata* según el fungicida utilizado y la zona de procedencia del hongo, al utilizar inóculo recolectado de diferentes localidades de la provincia de Córdoba. Se encontró menor eficiencia en la inhibición de la germinación de los conidios con aquellos fungicidas con mayor historial de uso (grupo químico de los triazoles). Por su parte, las carboxamidas lograron los mayores valores de inhibición, teniendo el grupo de las estrobilurinas un comportamiento intermedio (Oddino *et al.*, 2017).

Por otro lado, Stevenson y Culbreath (2006), reportaron un incremento en la frecuencia de detección de aislados del patógeno con sensibilidad reducida a uno de los triazoles más utilizados en Estados Unidos, tebuconazole. Los triazoles han sido utilizados en el control de viruela del maní durante más de 30 años, y ya se ha mencionado en varias oportunidades la disminución de eficiencia de control de diferentes ingredientes activos dentro de este grupo, como difenoconazole, tebuconazole, cyproconazole y epoxiconazole (March *et al.*, 2012; Oddino *et al.*, 2012). A su vez, tanto las estrobilurinas como los triazoles, han demostrado una menor inhibición en la germinación de los conidios al ser colectados de áreas con mayor historial de producción de maní, lo que demuestra la necesidad de continuar realizando ensayos para detectar el posible surgimiento de poblaciones resistentes a un determinado fungicida o grupo químico en ciertas áreas, y así poder modificar dosis y/o productos a utilizar en cada una (Oddino *et al.*, 2017). Es importante tomar medidas que minimicen el riesgo de pérdida de sensibilidad a los fungicidas (Culbreath *et al.*, 2020). A su vez, la mayor parte de la producción de maní de Argentina es exportado, y principalmente a la Unión Europea, donde se realizan mediciones del nivel de plaguicidas presentes. Teniendo en cuenta por otro lado, los efectos negativos que trae aparejado el uso masivo de los mismos sobre el agua, suelo y otros organismos vivos (Zubrod *et al.*, 2019), es que resulta necesario evaluar otras herramientas, que permitan un manejo sustentable y duradero de la enfermedad. Una de las

alternativas que surgen a esto, y que cada vez se evalúa frente a más patosistemas, es el control biológico (Köhl *et al.*, 2019).

3. Control biológico de patógenos

El control de enfermedades en las plantas, puede realizarse mediante el uso de organismos benéficos, o los productos que estos generan. El uso combinado de diferentes agentes de biocontrol o la integración de estos con otras herramientas de manejo de la enfermedad, mejora la protección de la planta y el espectro de actividad de los mismos (Jetiyanon y Kloepper, 2002; O'Brien, 2017; Tariq *et al.*, 2020). La reducción de las dosis de fungicidas utilizadas, sumado al empleo de agentes de biocontrol, ofrece un control efectivo de ciertas enfermedades de suelo, donde el control químico por sí solo, no es eficiente (Kondoh *et al.*, 2001); sin embargo, cuando se utilizan este tipo de técnicas, es importante tener en cuenta el riesgo que trae aparejado el uso de subdosis de fungicidas, debido al posible surgimiento de subpoblaciones resistentes del patógeno (van den Bosch *et al.*, 2011).

3.1. Antecedentes en maní

En Argentina hay trabajos en que se emplean distintos agentes de control biológico (ACB) frente a patógenos que afectan a este cultivo, como *T. frezii* (Ganuza *et al.*, 2018), *F. solani* (Rojo *et al.*, 2007; Erazo *et al.*, 2021) y *S. rolfsii* (Figueredo *et al.*, 2017).

Específicamente respecto al control biológico de viruela del maní, hay diversos estudios realizados hace ya un tiempo, donde se menciona la utilización de cepas bacterianas en diferentes centros de investigación de la India. Por ejemplo, Meena *et al.* (2002) reportaron un control de la enfermedad en condiciones de invernadero y de campo, mediante la aplicación de una formulación en polvo a base de *Pseudomonas fluorescens* Pfl a la semilla y al follaje. Kishore *et al.* (2005a) encontraron una disminución de la enfermedad e incremento del rendimiento con aplicación foliar de *Bacillus circulans* GRS 243 y *Serratia marcescens* GPS 5 suplementadas con quitina coloidal. También se logró disminuir la intensidad de la enfermedad mediante la aplicación de *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18 y *S. marcescens* GPS 5 suplementadas con quitina, debido a un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas (Kishore *et al.*, 2005b). Anil y Podile (2012) adoptaron un enfoque integrado, trabajando con una cepa de *Bacillus thuringiensis*

con actividad quitinolítica, tolerante a clorotalonil, que manipularon genéticamente para que exprese la proteína elicitora harpin Pss de *P. syringae* pv. *syringae*. Cuando aplicaron esta bacteria a las plantas, la severidad de la viruela tardía disminuyó considerablemente; al mismo tiempo, se obtuvo un mayor crecimiento de las plantas, principalmente en raíces, cuando las semillas fueron tratadas con dicha bacteria.

Existe a la fecha una sola publicación (Hasan *et al.*, 2014), donde reportaron una disminución de la viruela del maní y una promoción de crecimiento del cultivo, en ensayos realizados en Bangladesh, mediante el uso de un biofungicida a base de *Trichoderma* sp. aplicado a la semilla y por aspersión foliar; en comparación con un testigo y con el uso de productos a base de plantas.

En contraste con lo anterior, Zhang *et al.* (2001) en experiencias llevadas a cabo en Estados Unidos, no encontraron un biocontrol de la enfermedad y sugirieron que la resistencia a viruela tardía del maní no es sistémicamente inducible, como si observaron en otros cultivos al aplicar un grupo de PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas) y de elicitores de manera foliar; entre esos microorganismos se encontraban especies de los géneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Bacillus*.

3.2. Genero *Trichoderma*

Entre las especies de hongos más estudiadas y empleadas como ACB, se destacan las pertenecientes al género *Trichoderma* (Tariq *et al.*, 2020; Konappa *et al.*, 2022). *Trichoderma* pertenece al filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales. Son hongos saprófitos que sobreviven en la materia orgánica de los suelos, descomponiéndola; en ciertas condiciones pueden comportarse como anaerobios facultativos, lo cual les otorga una mayor plasticidad ecológica, encontrándose en todas las latitudes, debido a su alta capacidad enzimática, su metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Danay *et al.*, 2009).

Es un hongo de micelio septado, que produce conidióforos altamente ramificados, con un contorno cónico o piramidal, terminando en fiálides en las que se forman los conidios, las colonias pueden ser de color blanco, amarillo o verde (Rifai, 1969). La mayoría de las especies del género, presentan clamidosporas intercalares o terminales, las cuales toleran condiciones ambientales adversas, permitiéndole al hongo una mayor sobrevivencia (Stefanova *et al.*, 1999). A su vez, pueden formar estructuras tipo apresorio que sirven para ingresar en

los tejidos vegetales y penetrar hifas de hongos fitopatógenos (Nogueira-Lopez *et al.*, 2018; Larran *et al.* 2020).

Hay cepas que pueden colonizar las raíces de las plantas tras penetrar sus paredes celulares, y en algunos casos, comportarse como endófitos eficientes y persistir durante el ciclo de un cultivo (Martinez Medina *et al.*, 2016). Muchas especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. viride*, *T. atroviride*, *T. afroharzianum*, *T. virens* y *T. reesei*, han sido reportadas como endófitas, capaces de proveer a las plantas, efectos benéficos (Woo *et al.*, 2014; Harman y Uphoff, 2019; Ikram *et al.*, 2019). De todos modos, es importante resaltar que los efectos de estos microorganismos sobre las plantas, dependen de la interacción específica entre estas y cada cepa en particular (Harman *et al.*, 2021). Muchas veces el microorganismo se mantiene en el interior de las raíces de las plantas, teniendo efectos benéficos sobre otros órganos, es decir induciendo un efecto sistémico (Tseng *et al.*, 2020).

Las especies de este género poseen diferentes mecanismos de acción que le permiten el control de fitopatógenos, tales como competencia, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Si una cepa tiene varios de estos mecanismos, más eficiente y duradero resulta el control sobre el patógeno (Danay *et al.*, 2009).

Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Competencia: estos hongos están biológicamente adaptados para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir como clamidosporas. Su alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que pueden crecer, debido a la diversidad de enzimas hidrolíticas que producen, hacen que sean muy eficientes como saprófitos y como ACB (Singh *et al.*, 2018). Su gran capacidad de movilizar y absorber nutrientes, hace a las especies de este género, más eficientes y competitivas que muchos otros microorganismos del suelo para la colonización (Benitez *et al.*, 2004). Algunas cepas producen sideróforos que pueden detener el crecimiento de otros hongos (Erazo, 2020). Por otro lado, el ácido harziánico (metabolito secundario producido por muchas especies de *Trichoderma*), presenta actividad antifúngica, promueve el crecimiento vegetal y estimula la germinación de las semillas en ciertas especies. Además, se ha demostrado su habilidad para unirse a metales como el Fe^{+3} , lo cual puede representar un mecanismo de solubilización del hierro incrementando su disponibilidad para la planta (Vinale *et al.*, 2013). Frente a altas presiones de una enfermedad, podría no

ser un mecanismo muy efectivo, al verse limitado por la carga de inóculo del patógeno (Latz *et al.*, 2018).

Micoparasitismo: durante este proceso, el hongo crece quimiotróficamente hacia el hospedante, se adhiere a sus hifas, se enrolla y ocasionalmente las penetra. La degradación de las paredes celulares se puede visualizar en los estados tardíos del proceso, lo que genera un debilitamiento muy importante del patógeno (Carsolio *et al.*, 1999; Erazo *et al.*, 2021). Una vez que ocurre la infección, se desarrolla un sitio donde las hifas de *Trichoderma* interactúan con las del patógeno, en dicha zona de interacción química, las hifas de *Trichoderma* están en la planta, pero no la matan (Harman *et al.*, 2004; Harman y Shores, 2007). Este hongo secreta enzimas hidrolíticas específicas que degradan las células de la pared del hospedante, donde β -glucanasas, quitinasas, proteasas y glucosaminidasas son las principales enzimas involucradas (Erazo *et al.*, 2021).

Respecto a la capacidad enzimática, Anand y Jayarama (2009) resaltan las quitinasas por su alta actividad en este género. A su vez, Xia *et al.* (2018), encontraron que la expresión del gen *chit42* para quitinasa, procedente de un hongo entomopatógeno, en una cepa de *T. harzianum* aumentó su capacidad biocontroladora frente a *Botrytis cinerea*. Respecto a las glucanasas, Djonović *et al.* (2006) encontraron que al suprimir el gen *tvbng3* (codifica una β -1-6-glucanasa), se redujo el potencial micoparasítico de *T. virens* contra *Pythium ultimum*, mientras que al sobreexpresar dicho gen, la actividad parasítica fue evidentemente incrementada. Resultados similares se reportaron con la sobreexpresión de dos β -glucanasas (*TvBng2* y *TvBng3*) frente a *Rhizoctonia solani*, *P. ultimum* y *Rhizopus oryzae* (Djonović *et al.*, 2007). Cabe señalar que *Trichoderma* no solo parasita hifas activas, sino que también lo hace con estructuras como esclerocios y peritecios (Catalano *et al.*, 2011; Inch y Gilbert, 2011).

Antibiosis: muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios, volátiles y no volátiles, de los cuales algunos inhiben el desarrollo de otros microorganismos sin tener contacto físico (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Hay compuestos volátiles, con un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y haciéndolo más sensible a los antibióticos no volátiles (hiperparasitismo de origen enzimático) (Durman *et al.*, 2003).

Los antibióticos producidos tienen dos posibles mecanismos de acción. Los compuestos volátiles, apolares y de bajo peso molecular presentan una alta concentración en el suelo y poseen una distancia relativamente larga de acción. Mientras que otros poseen efecto a

corta distancia, actuando en la proximidad de las hifas productoras, dentro de este grupo se encuentran los antibióticos polares y peptaiboles (Vinale *et al.*, 2008a).

Stefanova *et al.* (1999) encontraron que los metabolitos no volátiles producidos por cuatro aislamientos de *Trichoderma*, redujeron el crecimiento micelial de distintos hongos patógenos mediante vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis celular. Algunas de las enzimas no sólo intervienen en el proceso de penetración y lisis, sino que actúan también como antibióticos, tal es el caso de la enzima endoquitinasa (Ech42) que causa hidrólisis en las paredes de *B. cinerea*, y además inhibe la germinación de conidios y el crecimiento de tubos germinativos de varios hongos (Carsolio *et al.*, 1999).

Inducción de defensas: la utilización de *Trichoderma* no se limita a combatir patógenos, sino que es un simbionte oportunista de las plantas, aumentando la resistencia sistémica de las mismas, permitiéndoles resistir a numerosos patógenos (Shoresh *et al.*, 2010). Una vez establecida la asociación con la planta, la fisiología de la misma es modificada, induciendo ciertos cambios, como mayor crecimiento y adquisición de resistencia a numerosas enfermedades (Marra *et al.*, 2006).

El tratamiento con hongos y bacterias biocontroladores sensibilizan a las plantas a defenderse contra el ataque de patógenos, desencadenando varios mecanismos de defensa, como fitoalexinas, síntesis de fenoles (Chen *et al.*, 2000; Madhaiyan *et al.*, 2006), acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (Meena *et al.*, 2000) y deposición de barreras estructurales (Benhamou *et al.*, 1996).

Las proteínas relacionadas a la patogénesis, como β -1,3-glucanasas y quitinasas, producen la lisis de la pared celular de los hongos. A su vez, la quitina y oligómeros glucanos liberados en esa degradación, actúan como elicitores de varios mecanismos de defensa en las plantas (Karthikeyan *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Gajera *et al.* (2015), se evaluó la inducción de enzimas de defensa involucradas en la ruta del fenilpropanoide y la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis en plántulas de maní infectadas con *Aspergillus niger* Van Tieghem, en respuesta a *T. viride* JAU60, encontrando una importante reducción de la enfermedad y un aumento significativo de la actividad específica de las enzimas polifenol oxidasa, β -1,3-glucanasa, fenilalanina amonio liasa y quitinasa en las plántulas tratadas.

Se ha encontrado que en muchos casos, las plantas tratadas con *Trichoderma* sp., aceleran la resistencia de las mismas al ataque de patógenos, al estimular la inducción de mecanismos como respuesta hipersensible, resistencia sistémica adquirida y resistencia

sistémica inducida (SAR e ISR, respectivamente, por sus siglas en inglés) (Benitez *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008b). Por otro lado, Manganiello *et al.* (2018) encontraron que el ácido harziánico tiene la capacidad de incrementar la expresión de genes relacionados a la defensa al aplicarse en plantas de tomate. La inducción de la defensa en la planta por *Trichoderma* suele ser ISR, que se emplea contra patógenos necrotróficos, o SAR, que suele ser desencadenada por patógenos biotróficos y hemibiotróficos, o ambas a la vez (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2018). Además, dicha resistencia parecería ser una característica que se hereda a la progenie (Medeiros *et al.*, 2017).

Una de las características comunes de las respuestas de resistencia inducida por microorganismos beneficiosos, es el efecto “priming” con el que las plantas responden más rápidamente y mejor frente al ataque posterior de un patógeno (Conrath, 2011). Esto no precisa la expresión de una costosa respuesta de defensa, ya que la activación de estos mecanismos, se da después del reconocimiento de un potencial intruso (Zamioudis y Pieterse, 2012); podría ser disparado por la acción de las citoquinas sintetizadas por los microorganismos benéficos, ya que con su aplicación, sólo se activan las defensas si hay infección de un patógeno (Albrecht y Argueso, 2016). Este mecanismo sería una solución frente al dilema que se plantea entre la protección de las plantas ante una enfermedad, y los costos asociados a la activación de la defensa (Hermosa *et al.*, 2013).

Promoción del crecimiento vegetal: además del control de patógenos, las especies del género *Trichoderma*, promueven el crecimiento de las plantas, desarrollo de raíces, rendimiento, resistencia a estreses abióticos y mejora la absorción y uso de los nutrientes (Harman *et al.*, 2004). Cutler *et al.* (1989) encontraron que “koniningin A” es un metabolito secundario producido por *T. koningii*, que puede regular el crecimiento vegetal. A su vez, distintas especies del género, producen ácido cítrico y glucónico, bajando el pH del suelo y favoreciendo la solubilización de fosfatos, hierro, magnesio, manganeso y otros micronutrientes (Benitez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008b). En un trabajo realizado por Mastouri *et al.* (2010), las semillas de tomate que fueron tratadas con *T. harzianum* T22, germinaron más rápido y de manera más uniforme que las no tratadas, bajo condiciones de estrés osmótico, salino o por bajas temperaturas. Esta cepa redujo la acumulación de peróxidos de lípidos en las plántulas bajo estrés osmótico y en semillas viejas, logrando un mayor vigor de plántulas y disminuyendo el estrés gracias a la inducción de protección fisiológica en las plantas ante el daño oxidativo.

Los mecanismos de defensa de este género, involucran compuestos químicos y enzimáticos que lo hacen eficientes como micoparásitos, antagonistas y agentes de biocontrol; cualidades que pueden ser aprovechadas utilizando al hongo o sus metabolitos secretados, como fungicidas biológicos en el manejo de enfermedades fúngicas (Vinale *et al.*, 2009; Konappa *et al.*, 2022). Las especies de *Trichoderma* más importantes en el campo del biocontrol, son *T. atroviride* (al principio mal llamado *T. harzianum*), *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*, cuya actividad antagonista está basada en la activación de múltiples mecanismos (Benitez *et al.*, 2004; Hamid y Mohiddin, 2018). En nuestro grupo de trabajo, se han reportado disminuciones en la intensidad de enfermedades del maní, como podredumbre parda de la raíz por *F. solani* (Rojo *et al.*, 2007; Erazo *et al.*, 2021) y carbón por *T. frezii* (Ganuza *et al.*, 2018) al aplicar un bioformulado de *T. harzianum* ITEM 3636, sin afectar la microbiota del suelo (Ganuza *et al.*, 2019).

3.3. Genero *Pseudomonas*

De manera general, la aplicación de PGPR es una alternativa muy importante para disminuir el estrés causado en las plantas por factores abióticos. Las plantas inoculadas, sufren modificaciones morfológicas y bioquímicas, que les otorgan mayor tolerancia a estos factores (tolerancia sistémica inducida), a través de varios mecanismos como producción de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, reducción de la producción de etileno, modificación en el contenido de fitohormonas, inducción de la síntesis de enzimas antioxidativas en la planta, mejora en la toma de nutrientes esenciales, producción de sustancias poliméricas extracelulares, menor absorción de metales pesados e inducción de genes de resistencia a estrés abiótico (Etesami y Maheshwari, 2018).

Entre las cepas bacterianas más empleadas en los últimos años para el control biológico de enfermedades en cultivos, se destacan las pertenecientes al género *Pseudomonas* (Tariq *et al.*, 2020), con un amplio espectro de actividad antifúngica, debido entre otras razones, a los antibióticos volátiles que producen (Haas y Keel, 2003; Viji *et al.*, 2003). Distintas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes (capaces de desarrollar una coloración fluorescente en medio de cultivo específico), han sido reportadas como potenciales biocontroladores contra *Sclerotium rolfsii* en diferentes cultivos (Singh *et al.*, 2003; De La Fuente *et al.*,

2004); en tomate, Pastor *et al.* (2010) encontraron a su vez un mayor número de plantas emergidas y peso seco de sus raíces en un ensayo en cámara de incubación.

Muchas especies de *Pseudomonas* son conocidas como PGPR en varios cultivos, y como potenciales agentes de biocontrol (O'Brien, 2017). Entre sus principales mecanismos resaltan la competición por hierro mediada por sideróforos, competencia por nutrientes y espacio, resistencia sistémica inducida y producción de compuestos antimicrobianos (Haas y Défago, 2005; Bakker *et al.*, 2007).

Por otro lado, este género posee muchas características que lo hacen adecuado para su empleo como biocontrolador y promotor de crecimiento (Weller, 2007; Hernández-León *et al.*, 2015). Muchas de las cepas usadas para biocontrol, pertenecen a *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* y *P. putida* (McSpadden Gardener, 2007; Couillerot *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2017). Por ejemplo, *P. putida* A1, inhibe el crecimiento de algunas bacterias fitopatógenas, posiblemente debido a la secreción de metabolitos bioactivos, representando una importante actividad antimicrobiana (Sun *et al.*, 2017).

En el cultivo de maní no abundan los trabajos realizados con ACB de este género, salvo los estudios mencionados previamente (Meena *et al.*, 2002; Kishore *et al.*, 2005b), y otro similar en donde prueban una cepa de *P. aeruginosa* frente a *S. rolfisii* en aplicaciones a la semilla (Kishore *et al.*, 2005c). Unos años más tarde, Tonelli *et al.* (2011) encontraron menor severidad del marchitamiento del maní (*S. rolfisii*), al inocular las raíces con una suspensión de una cepa de *Pseudomonas* sp., atribuyendo esto a la protección mediada por ISR, debido a la lejanía espacial del hongo y la bacteria. Dicha inducción de respuestas de defensa, está asociada a la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis, entre ellas: β -1,3- glucanasa, enzima de defensa PAL (fenilalanina amonio liasa) y enzimas oxidativas como PO (peroxidasa) (Compant *et al.*, 2005).

4. *Trichoderma*, *Pseudomonas* y fungicidas químicos

Normalmente a campo, se integran herramientas de control de enfermedades, al elegir lotes según su historial, mantener rotaciones de cultivos, utilizar genotipos de buen comportamiento (cuando hay disponibilidad), elegir fechas de siembra, entre otros. A esto, se suma la aplicación de fungicidas, orientados a la prevención y/o control de las enfermedades en los cultivos.

La utilización de ACB de manera integrada con otras herramientas, principalmente a fungicidas, es una práctica que se viene estudiando hace un tiempo, debido a las ventajas que tendría dicha asociación, principalmente vinculados a una menor dependencia de los fungicidas de síntesis. Esto supone costos más bajos para el productor, menor impacto al ambiente y una mayor duración de la eficiencia de estos principios activos, por la menor presión de selección sobre la población de patógenos (Meshram *et al.*, 2022).

Manjula *et al.* (2004), estudiaron el desempeño de distintas cepas de *P. fluorescens* con buenas características como biocontroladoras de *S. rolfsii*, frente a una cepa de *T. viride* y al fungicida thiram, encontrando que el crecimiento bacteriano fue compatible con los mismos en ensayos *in vitro*. Luego, en ensayos de invernadero, aplicaron las bacterias a semillas de maní, probando del mismo modo a *T. viride* y al fungicida químico, solos o en coinóculo con *Pseudomonas*, y encontraron una mayor protección de las plántulas frente a la enfermedad, lo cual fue más significativo cuando se aplicó *Pseudomonas* más *Trichoderma* que cuando se aplicó el fungicida solo, o los microorganismos por separado.

Kishore *et al.* (2005d), observaron una disminución de la intensidad de la viruela tardía del maní en invernadero, al aplicar de manera foliar concentrados bacterianos de dos cepas de *P. aeruginosa* tolerantes a clorotalonil de manera conjunta con el mismo, manteniendo un bajo nivel de la enfermedad; algo similar observaron a campo con una de las cepas, encontrando que la dosis del fungicida podía ser disminuida considerablemente al integrar ambas herramientas.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

El bioformulado a base de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, aplicado solo o con *Pseudomonas putida* RC-93 y combinado con fungicidas es efectivo para el control de la viruela del maní.

Trichoderma/Pseudomonas desencadenan mecanismos de defensa frente a *Nothopassalora personata*, agente causal de la viruela tardía del maní, con un aumento de componentes celulares que juegan un rol importante en la respuesta de defensa de la planta.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar un bioformulado de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 solo o en co-inóculo con *Pseudomonas putida* RC-93 y asociado a fungicidas para el control de la viruela del maní (*Nothopassalora personata*), profundizando en el estudio del efecto de estos microorganismos sobre la respuesta sistémica de defensa.

2.2. Objetivos específicos

1- Evaluar el efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 solo o en co-inóculo con *Pseudomonas putida* RC-93 sobre la viruela del maní causada por *Nothopassalora personata*, en ensayos de invernadero.

2- Determinar compuestos asociados a la inducción de defensa en maní por *Pseudomonas putida* RC-93 y/o *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, frente a *Nothopassalora personata*.

3- Observar la interacción y colonización de raíces de maní por *Trichoderma harzianum* ITEM 3636.

4- Valorar la eficiencia del bioformulado a base de *T. harzianum* ITEM 3636 solo o en co-inóculo con *P. putida* RC-93 y su efecto combinado con fungicidas químicos, sobre la viruela del maní causada por *Nothopassalora personata*, en ensayos a campo.

III. METODOLOGÍA GENERAL

III. METODOLOGÍA GENERAL

La presente sección, tiene la finalidad de reunir toda la metodología en común, empleada a lo largo del desarrollo de la tesis, y los resultados y discusión que se desprenden de su análisis. El presente trabajo se basó en el planteo de un manejo integrado de la viruela tardía del maní, mediante el uso de microorganismos, como potenciales ACB y de fungicidas de síntesis química, normalmente utilizados para su control.

Se realizaron diversas actividades en laboratorio, tanto en la UNRC (Río Cuarto, Argentina), como en la UFRRJ y en EMBRAPA Agrobiología (Río de Janeiro, Brasil), para el estudio de los microorganismos empleados como ACB y para la preparación de inóculo y tratamiento de semillas. Se llevaron a cabo ensayos en condiciones semicontroladas en invernadero, para evaluar el efecto de estos microorganismos sobre el crecimiento de las plantas de maní y su efecto sobre viruela tardía. Finalmente, se ejecutaron ensayos de campo en diferentes años y localidades, con la finalidad de estudiar el efecto de estos potenciales ACB aplicados a las semillas, sobre el rendimiento del cultivo y su comportamiento frente a la enfermedad, en combinación con la aplicación foliar de fungicidas de síntesis química registrados para su control.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Cultivar y curado de semillas

Se utilizaron semillas de maní (*Arachys hypogaea* L.) cv. Granoleico, que es el más sembrado en todo el país. Es un cultivar tipo *Runner* Alto oleico, con alto potencial de rendimiento, excelente producción de granos calidad confitería, gran adaptabilidad a todas las regiones agroecológicas del país y otros países. Posee hábito de crecimiento rastrero, muy ramificado, con un ciclo de 160 días promedio, posee granos ovalados de color rosa pálido (Soave *et al.*, 2004).

Las semillas fueron acondicionadas con una mezcla de dos productos cusarequilla comerciales, Rancona Dimensión® + Vitavax flo® a una dosis de 2 y 2,5 cm³ por kilogramo de semillas, para disminuir el ataque de patógenos a las mismas. Los principios activos del primer producto, ipconazole 2,5% p/v + metalaxil 2% p/v, pertenecen a los grupos químicos de los triazoles y de las acilalaninas, respectivamente. Ipconazole actúa de manera preventiva y curativa, alterando la biosíntesis de la membrana celular de los

hongos; mientras que metalaxil actúa a nivel de la síntesis de ácidos nucleicos. Por otro lado, los principios activos del segundo producto comercial, carboxin 20% p/v + thiram 20 % p/v, pertenecen a los grupos químicos de las oxatin-carboxamidas y los ditiocarbamatos, respectivamente. Carboxin interfiere en el proceso respiratorio del hongo y posee un efecto estimulante del crecimiento de las plantas al favorecer la actividad enzimática y estimulación de la transformación de nitratos en componentes orgánicos; por su parte, thiram posee acción de contacto, multisitio. Esta mezcla es utilizada en lotes destinados a producción comercial, y ha demostrado buenos resultados en ensayos a campo (Maier *et al.*, 2017).

1.2. Preparación del inóculo de los ACB

1.2.1. Cepa fúngica

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 para todos los ensayos, la cual fue aislada desde esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* en cultivo de maní, por investigadores de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) y depositada en el Istitute Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, en Italia. La cepa se mantuvo en placas de Petri conteniendo Agar Extracto de Malta (AEM) a 4°C y en glicerol al 15% (AEM - 15% glicerol) a -80°C.

Para el crecimiento de los cultivos empleados en los ensayos, se utilizaron placas de AEM inoculadas con el hongo, incubadas por 7-10 días en cámara a 28°C con ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, para favorecer su esporulación (Ganuza *et al.*, 2018). Cuando los cultivos cubrieron la placa, se colocó 10 ml de agua destilada estéril en cada una y se cosechó el micelio y conidios con espátula de Drigalsky; posteriormente se filtró el líquido obtenido a través de gasas (para retener el micelio) a un frasco de borosilicato, al que luego se le adicionó agua destilada estéril hasta llegar a un volumen final de 400ml. A partir de la suspensión de esporas, se realizó un recuento de conidios en microscopio (aumento de 40X), utilizando una cámara de Neubauer (Boeco, Alemania), obteniendo una concentración de $2,3 \times 10^7$ conidios por mililitro. Finalmente, se diluyó la suspensión de conidios en agua destilada estéril hasta la concentración deseada para realizar su inoculación.

1.2.2. Cepa bacteriana

La cepa utilizada fue *Pseudomonas putida* RC-93, aislada de rizósfera de maní por investigadores de la UNRC, que se sembró en medio *Pseudomonas* agar F (también llamado King B), se desarrolló dos días en cámara en condiciones de oscuridad a 28°C y luego se conservó a 4°C (King *et al.*, 1954). Para su utilización en los ensayos, la cepa se sembró en Erlenmeyer conteniendo caldo tripteína soya, se incubó en agitador orbital (130 rpm) a 28°C por 24 horas, y posteriormente se almacenaron a 4°C. Se determinó el recuento de células viables en el cultivo realizando diluciones seriadas factor 10 en agua peptonada al 0,1% y sembrando en superficie (por duplicado) una alícuota de 0,1 ml de cada dilución en placas con medio agar tripticasa soya (ATS). Se incubó 24 hs a 28°C en oscuridad. Finalizada la incubación, se obtuvo un recuento de aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonia (UFC) por ml. Al igual que para la cepa fúngica, a partir de la suspensión pura, se realizaron diluciones con agua destilada estéril hasta la concentración deseada para su aplicación.

1.3. Inoculación de semillas

Para todos los ensayos realizados, independientemente del año y de los tratamientos evaluados en cada uno, se procedió de igual manera a la hora de inocular las semillas de maní con las distintas suspensiones. Se fraccionó la cantidad total de semillas a utilizar en bolsas más pequeñas, a cada una se le adicionó carboximetilcelulosa (CMC) al 2% (en agua destilada estéril); se realizó un suave mezclado de un minuto para incorporar homogéneamente la CMC, y por el término de una hora, se realizaron movimientos suaves cada diez minutos con la finalidad de secar las semillas sin que se peguen unas a otras, posteriormente se incorporaron las distintas suspensiones:

- a) 5×10^6 conidios de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636/ml
- b) 5×10^6 UFC de *Pseudomonas putida* RC-93/ml
- c) Las mismas concentraciones de a y de b juntas, completando el mismo volumen.
- d) Agua destilada estéril en el caso del testigo.

Luego las bolsas se agitaron para homogeneizar su contenido, se las dejó secar nuevamente del mismo modo que con el agregado de la CMC y se sembraron al día siguiente. Tanto las

suspensiones (a-d), como la CMC 2%, fueron incorporadas en una relación de 100ml por cada kilogramo de semillas.

1.3.1. Recuento de conidios a partir de semillas inoculadas

Con la finalidad de determinar si la aplicación de los fungicidas curasemillas era compatible con la inoculación del hongo, se determinó el recuento mismo luego del contacto con los curasemillas, para esto se realizó un recuento de UFC a partir de diluciones seriadas, partiendo de semillas curadas e inoculadas. Se colocaron 10 gramos de semillas en un frasco Erlenmeyer con 90 ml de agua peptonada estéril al 0,1%, y se agitó durante 30 min en agitador orbital (dilución 1 en 10 o 10^{-1}), y a partir de allí las subsiguientes diluciones hasta 10^{-6} . Se realizó la siembra en placas conteniendo agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) por diseminación en superficie con espátula Drigalski, colocando 0,1 ml de cada dilución; todos los recuentos se realizaron por cuadruplicado. Las placas fueron incubadas en estufa a 28°C, en oscuridad para que el fungicida del medio de cultivo no perdiera sus propiedades, y fueron observadas a diario hasta la realización del recuento de las colonias.

1.4. Evaluación del poder germinativo de las semillas tratadas

De las semillas inoculadas como se detalló anteriormente, destinadas a los ensayos de invernadero 2020-2021, una parte se utilizó para la estimación del poder germinativo (PG). En recipientes de 40 x 30 cm y 25 cm de profundidad, se colocó 5 kg de arena y se humedecieron hasta alcanzar capacidad de campo (500 ml de agua), lo que se corresponde con el contenido hídrico del suelo luego de que este se saturó de agua y se lo dejó drenar por 48 horas (Shaxson y Barber, 2005). En cada recipiente, se separó la mitad de la arena, se colocaron 100 semillas de manera equidistante (Figura 3), y se las cubrió con la otra mitad de arena. Los recipientes se taparon y fueron colocados por 10 días en cámara de germinación a 25°C. Los tratamientos evaluados fueron: T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 5×10^6 conidios/ml, P: *Pseudomonas putida* RC-93 5×10^6 UFC/ml, TP: *T. harzianum* ITEM 3636 más *P. putida* RC- 93, ambas a 5×10^6 , C: control, con agua destilada estéril, y se adicionó un tratamiento CA: control absoluto, donde las semillas solo fueron curadas con el fungicida químico, no recibieron la aplicación de CMC ni de agua. Se sembraron

dos recipientes por tratamiento y a los 10 días después de la siembra (DDS) se cuantificó: porcentaje de plántulas normales (PG), vigor o primer conteo (porcentaje de plántulas normales a los cinco días de la siembra), plántulas anormales (con presencia de deformaciones en radícula o hipocótilo), plántulas anormales por patógeno (plántula con necrosamiento en alguna parte), semillas frescas (consistencia dura al presionar entre dedo índice y pulgar) y semillas muertas (blandas al presionar con los dedos) (Figuras 4 y 5).



Figura 3: Colocación de semillas en recipiente con arena para evaluar PG.



Figura 4: Observación 10 DDS. De izquierda a derecha: plántulas normales, semillas frescas, plántulas anormales y semillas muertas.



Figura 5: Plántulas de 10 días normales y vigorosas.

1.5. Evaluación de la técnica de inoculación a las semillas, observación en microscopio electrónico de barrido

Para poder determinar si la carboximetilcelulosa es un buen adherente para el tratamiento de semillas, se realizó un estudio de recuento con microscopio electrónico de barrido en las semillas tratadas. En primer lugar, se generó un preparado puro de conidios para poder observar su forma y tamaño; para ello se pasaron 2 ml de la suspensión concentrada, utilizada para la inoculación de las semillas, a través de un filtro de 0.22 μm . Una vez que todo el líquido atravesó el filtro, se dejó secar por 24 horas (Figura 6) y luego se procedió a su observación en microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss EVO LS 10 (Figura 7).

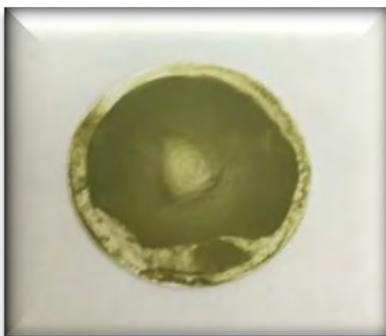


Figura 6: Suspensión filtrada de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 para su observación en microscopio electrónico de barrido.



Figura 7: Microscopio electrónico de barrido, EMBRAPA Agrobiología, Rio de Janeiro, Brasil.

Luego, se evaluó la adhesión de los conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 al tegumento de las semillas de maní, mediante la utilización de CMC 2%. Para ello, se desinfectaron 5 gr de semillas para cada tratamiento, colocándolas 30 s en alcohol 70 %, luego 3 min en hipoclorito 2-2.5 % y posteriormente se hicieron cinco lavados consecutivos en agua destilada estéril. Se dejaron secar sobre papel estéril en flujo laminar y luego se incorporaron 0,5 ml de CMC al 2 %, se dejaron secar y se colocó 0,5 ml de agua (C) o 0,5 ml de la suspensión fúngica (T) 5×10^6 . Una vez que se secaron dentro del flujo, en bolsas de nylon, se tomaron tres semillas al azar de cada tratamiento, cada una fue cortada por la mitad y posteriormente en ocho fragmentos, de esos 16 fragmentos por semilla, se tomaron al azar tres, y de cada uno se tomaron tres fotos (nueve fotos por semilla, 27 por tratamiento) (Figura 8). Posteriormente se procedió a realizar su recuento, usando la plataforma Fiji del Software Imagen J (Schindelin *et al.*, 2012). El conteo de conidios de cada una de las imágenes fue realizado dos veces para minimizar errores, luego ambos valores se promediaron. Posteriormente se promedió el valor del recuento de las 27 imágenes y se calculó su error estándar para así estimar un número de conidios de una manera más exacta. Después se midió la superficie media de las semillas empleadas; para ello, se tomaron ocho semillas desinfectadas (para que tuvieran igual tamaño y textura que las usadas para el recuento), se sacó cuidadosamente el tegumento de cada una, se tomó fotos de los mismos, junto a una regla y se calculó su superficie utilizando el programa citado anteriormente (Figura 9). De esta manera, conociendo el área de las imágenes y la de los tegumentos, se pudo estimar el número de conidios adheridos a cada semilla.



Figura 8: Cortes y montado de semillas para su observación en microscopio electrónico de barrido.

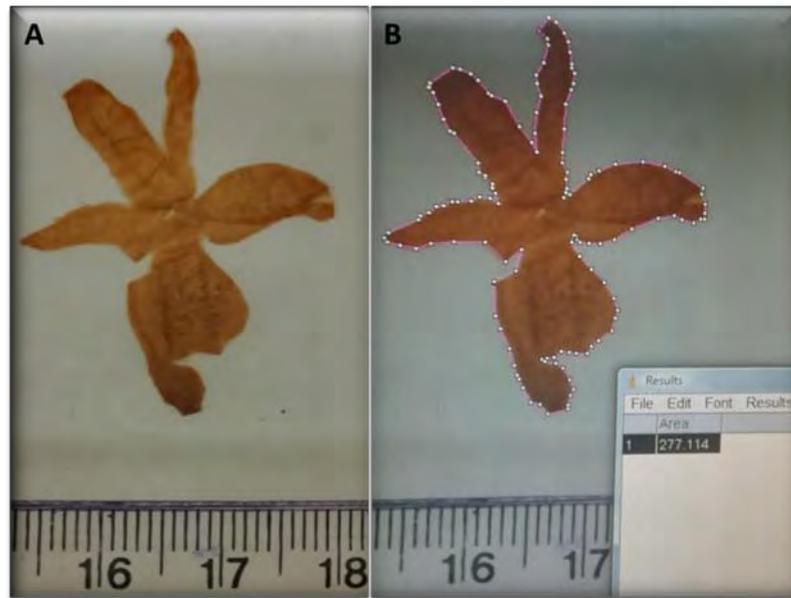


Figura 9: Corte y visualización de tegumento de semilla de maní para estimación de su superficie. A) Fotografía de tegumento junto a regla. B) Medición de su superficie utilizando el programa Imagen J.

1.6. Análisis estadístico

La evaluación de todos los datos fue realizada mediante análisis de la varianza (ANOVA) y test de comparación de medias DGC ($p < 0.05$) con el programa InfoStat-Windows (Di Rienzo *et al.*, 2017).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. Efecto de fungicidas curasemillas sobre *Trichoderma harzianum* ITEM 3636

Si bien, nuestro principal objetivo es contribuir a una producción de maní con niveles menores de químicos sintéticos, sabemos que la eliminación total de estos productos puede traer algunas desventajas, por lo tanto se piensa en un manejo integrado de patógenos del suelo usando una combinación de biológicos y químicos. Con esta premisa, se realizaron experimentos para evaluar la posibilidad de combinar *T. harzianum* ITEM 3636 con fungicidas de uso común en maní infiriendo así su compatibilidad para una posible inoculación conjunta.

El recuento de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 a partir de las semillas tratadas, arrojó valores que oscilaron entre $7,2 \times 10^4$ y $3,7 \times 10^5$ conidios/ml (Figura 10). Teniendo en cuenta que la inoculación a las semillas se realizó a razón de 5×10^6 conidios/ml, el valor en el recuento bajó entre uno y dos órdenes, lo que coincide con lo encontrado por Ganuza *et al.* (2018), en el que incluso se utilizaron principios activos similares. Los valores obtenidos, se consideran una buena cantidad de inóculo, ya que más allá de algún posible efecto del fungicida, normalmente, no todos los conidios germinan y generan colonias cuando se los siembra en medios de cultivo; demostrando que la aplicación de *T. harzianum* ITEM 3636 en las semillas de maní, es compatible con el uso de estos fungicidas curasemilla.

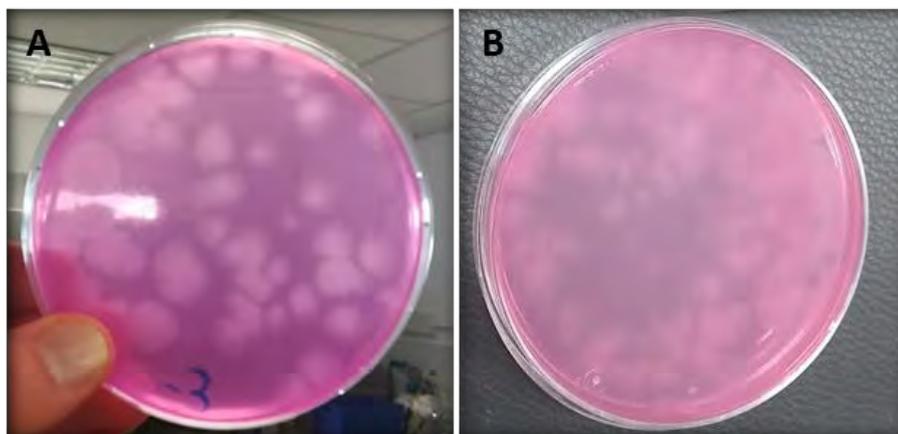


Figura 10: Placas de DRBC sembradas con (A): dilución 10^{-3} (B) 10^{-2} , a partir de semillas curadas e inoculadas con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636.

2.2. Evaluación del poder germinativo de las semillas tratadas

Es importante saber si los microorganismos que se aplican a las semillas, generan algún problema al momento de su germinación o emergencia, por ello es necesario evaluar el poder germinativo (PG) y otros parámetros, para comparar si hay algún efecto tras su inoculación, respecto a semillas no inoculadas.

No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 2). Se pudo observar que el acondicionamiento de las semillas con las diferentes suspensiones, no afectó su germinación y vigor, en el Test patrón de germinación, incluso los valores encontrados fueron mejores al compararlos con el tratamiento control (C). A su vez, se puede observar que todo el tratamiento a las semillas, desde la aplicación de CMC 2% no afectó los parámetros evaluados, lo que se evidencia con los resultados del control absoluto (CA) respecto al resto de los tratamientos.

Tabla 2: Parámetros evaluados a los 10 días después de la siembra en arena, según tratamiento realizado a las semillas de maní

Trat.	Vigor	Poder Germinativo	Anormales	Anormales por patógeno	Semillas muertas	Semillas frescas
CA	46,5 ± 0,5 a	67,5 ± 2,5 a	3,5 ± 0 a	18,0 ± 4,0 a	10,0 ± 2,0 a	1,5 ± 0,5 a
C	25,5 ± 14,5 a	36,5 ± 20,5 a	8,5 ± 2,5 a	31,5 ± 8,5 a	21,5 ± 9,5 a	2,0 ± 0 a
T	36,5 ± 0,5 a	53,0 ± 4,0 a	6,0 ± 0 a	28,0 ± 2,0 a	12,5 ± 1,5 a	0,5 ± 0,5 a
P	55,5 ± 2,5 a	80,5 ± 0,5 a	3,0 ± 1,0 a	9,0 ± 4,0 a	4,5 ± 0,5 a	3,0 ± 2,0 a
TP	45,5 ± 16,5 a	60,5 ± 23,5 a	2,0 ± 1,0 a	23,0 ± 18,0 a	11,0 ± 3,0 a	3,5 ± 1,5 a

Valores expresados en porcentaje ± error estándar. CA: control absoluto. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Las concentraciones utilizadas para la inoculación de las semillas, guardan relación con las utilizadas en otros trabajos, donde se observó que la misma, no generaba perjuicios en la germinación de las semillas, tanto para el caso de *T. harzianum* ITEM 3636 (Ganuzza *et al.*, 2018), como para *Pseudomonas*, donde incluso las concentraciones usadas són mas altas que en este trabajo, sin generar perjuicios (Pastor *et al.*, 2010). Normalmente, las mayores diferencias se observan entre aplicar o no un curasemillas de síntesis química (Maier *et al.*, 2017), más allá del tratamiento con ACB a la semilla (Rojo *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos trabajos reportan una mayor germinación y vigor de plántulas, con la aplicación de ACB a las semillas, como *P. putida* RC-93 (Gupta *et al.*, 2020). Los resultados

encontrados en el presente trabajo, demostraron que el tratamiento a las semillas con CMC y la inoculación con las diferentes suspensiones, no generó un perjuicio en la germinación de las semillas, como así tampoco se observó un beneficio en los parámetros evaluados, debido al uso de estos microorganismos.

2.3. Observación en microscopio electrónico de barrido

Con la finalidad de evaluar la adhesión de los conidios a las semillas de maní mediante el uso de carboximetilcelulosa, se realizaron observaciones en microscopio electrónico de barrido, tanto para observar las características de los conidios individualmente, como para realizar una estimación cuantitativa del número de conidios que efectivamente se adhirieron a las semillas.

Los preparados realizados a través de la filtración de la suspensión pura, permitieron observar el tamaño y forma de los conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 (Figuras 11 a 13). Estos tenían una forma redondeada, con el centro ligeramente hundido, a causa de la presión de trabajo; el tamaño promedio de los mismos fue de $2,38 \pm 0,33 \mu\text{m}$, luego de medir más de 100 conidios al azar.

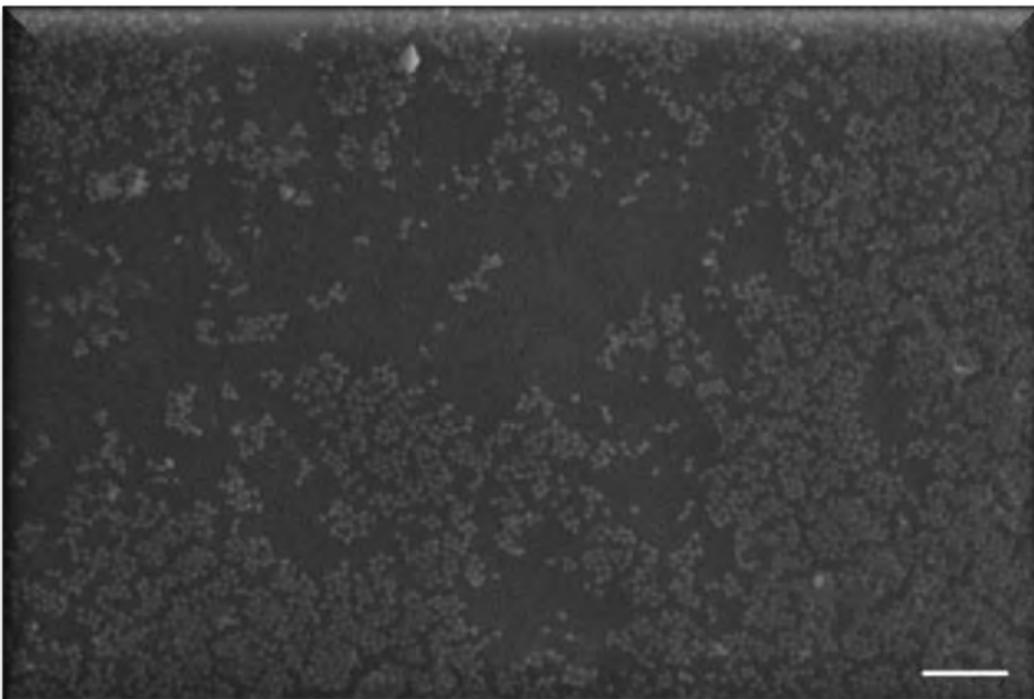


Figura 11: Imagen de microscopio electrónico de barrido con 1,23 K de aumento. Suspensión de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 sobre filtro 0,22 μm . Escala gráfica: 20 μm .

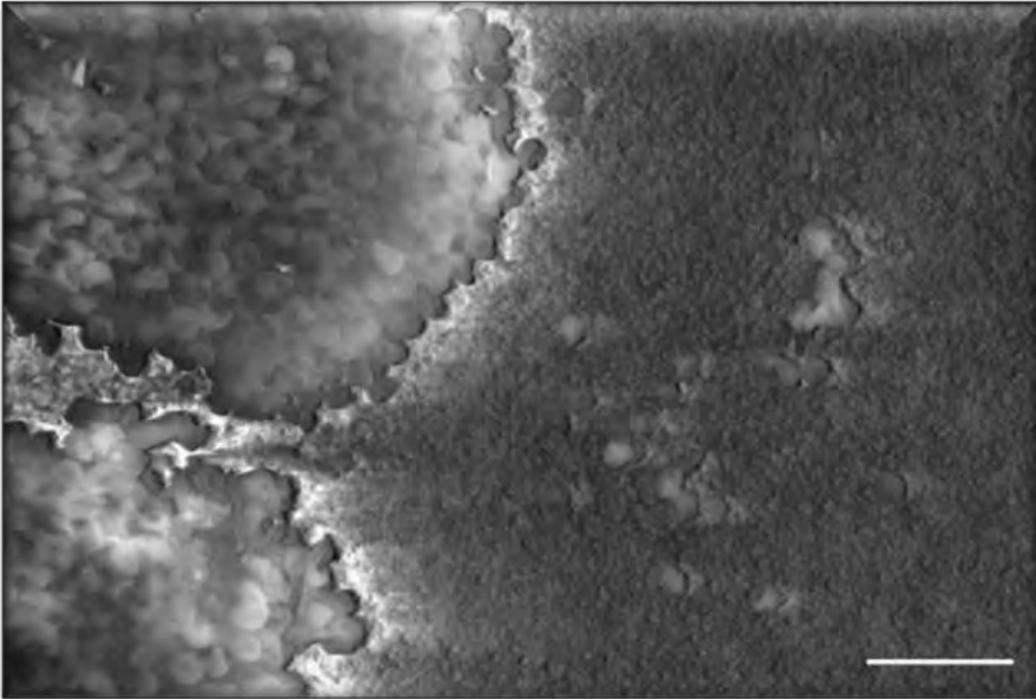


Figura 12: Imagen de microscopio electrónico de barrido con 4,16 K de aumento. Suspensión de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 sobre filtro de 0,22 µm. Escala gráfica: 10 µm.

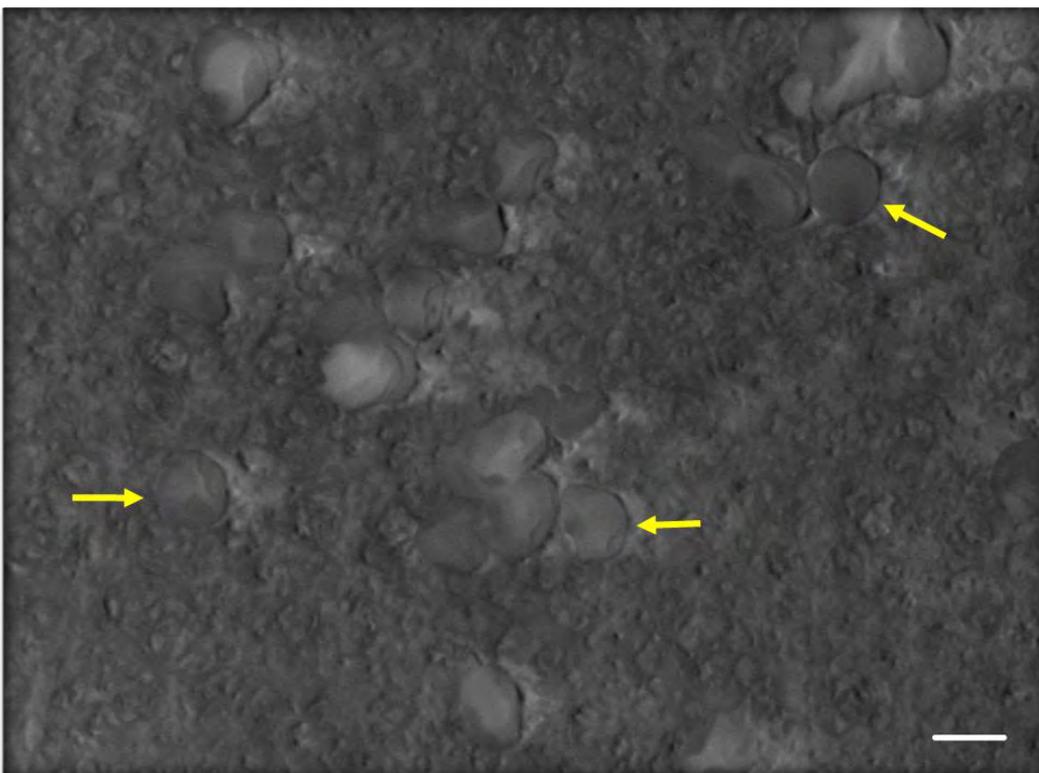


Figura 13: Imagen de microscopio electrónico de barrido con 9,07 K de aumento. Suspensión de conidios de *T. harzianum* ITEM 3636 sobre filtro de 0,22 µm. Las flechas señalan algunos conidios. Escala gráfica: 2µm.

Respecto al número de conidios por imagen, como se esperaba, no se encontró ningún conidio ni de *T. harzianum* ITEM 3636 ni de ningún otro hongo en los controles. En las 27

imágenes de los fragmentos de semillas tratadas con *T. harzianum* ITEM 3636, se encontró un promedio de alrededor de 25 conidios por imagen (Figuras 14 y 15).

La superficie observada, abarcaba 0,04 mm² (estimada por la escala de la imagen, con ayuda del programa Imagen J). Conociendo que la superficie promedio de los tegumentos de las semillas, calculadas con el mismo programa, fue de 276,78 mm², por regla de tres se pudo estimar el número de conidios promedio, adheridos a la semilla con este tratamiento en 185,806 conidios por semilla. Calculando el error estándar, el número estimado sería: $1,85 \pm 0,21 \times 10^5$ conidios por semilla. Teniendo en cuenta que el peso medio de las semillas utilizadas, estaba entre 0,7 y 1 gr, y la concentración del inóculo fue 5×10^6 conidios/ml, aplicado a razón de 1 ml cada 10 gr de semillas, la cantidad de conidios que recibió cada una, debió estar entre $3,5$ y 5×10^5 . Por esto se considera que la utilización de CMC como adherente, es una buena herramienta para el tratamiento de las semillas, y se ha utilizado en otros ensayos del grupo de trabajo (Ganuzza *et al.*, 2018; Erazo *et al.*, 2021). Se conoce que este polisacárido disminuye la tensión superficial de la suspensión y mejora su dispersión sobre las superficies hidrofóbicas, como las semillas (Carrillo *et al.*, 2020).

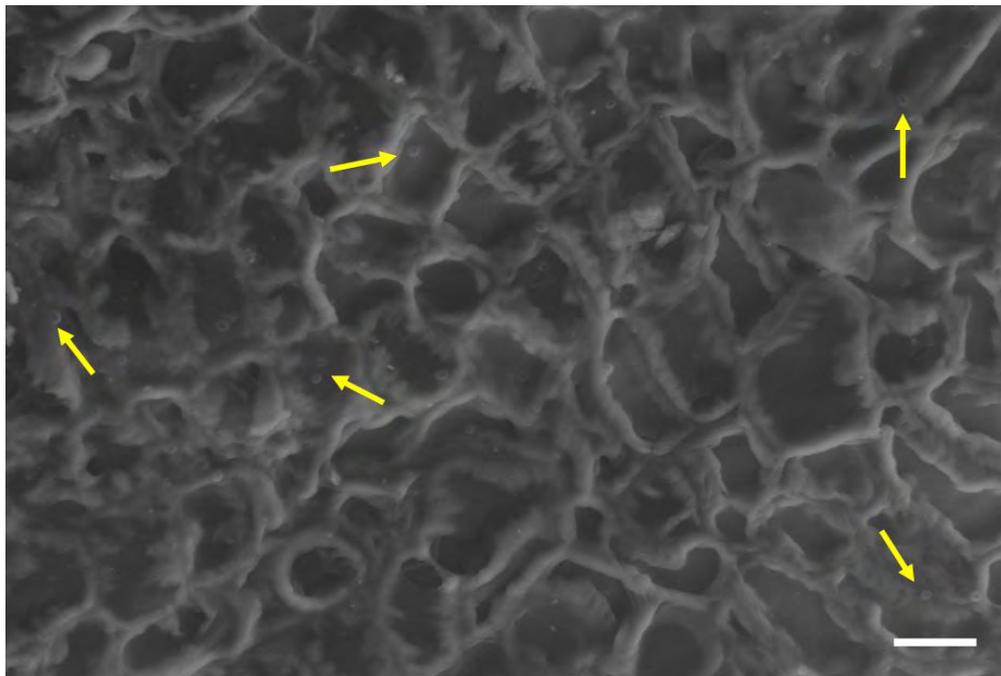


Figura 14: Imagen de microscopio electrónico de barrido. 1,21 K de aumento. Superficie de semilla de maní inoculada con *T. harzianum* ITEM 3636. Las flechas señalan conidios. Escala gráfica: 20 μ m.

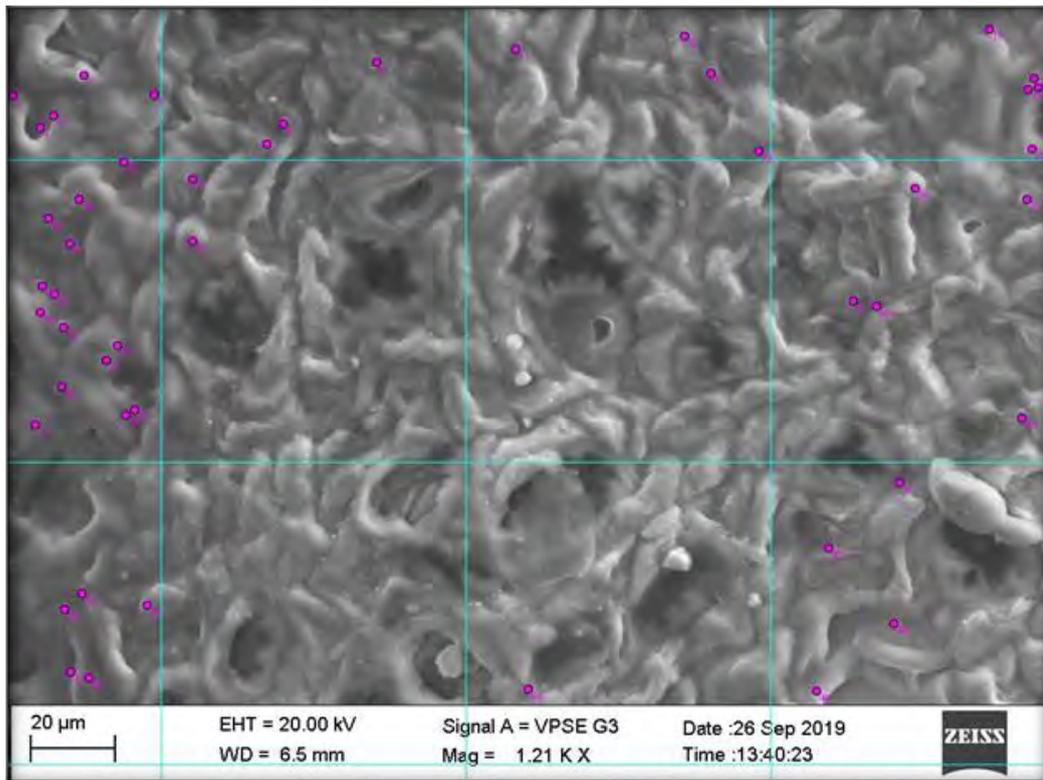


Figura 15: Imagen de microscopio electrónico de barrido, procesada en el Programa Imagen J. Utilización de matriz (grilla celeste) y herramienta de conteo (puntos fucsia) para realizar el recuento de conidios.

IV. OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Evaluar el efecto del bioformulado de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 y *Pseudomonas putida* RC-93 sobre la germinación, crecimiento, producción e intensidad de la viruela tardía (*Nothopassalora personata*) en plantas de maní bajo condiciones de invernadero

IV. Evaluar el efecto del bioformulado de *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 y *Pseudomonas putida* RC-93 sobre la emergencia, crecimiento, producción e intensidad de la viruela tardía (*Nothopassalora personata*) en plantas de maní bajo condiciones de invernadero

Con la finalidad de determinar si la aplicación de los microorganismos *T. harzianum* ITEM 3636 y *P. putida* RC-93 tiene un efecto sobre la emergencia de plántulas de maní, el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas, y sobre la intensidad de viruela tardía, se llevaron a cabo en primer lugar, ensayos en condiciones de invernadero.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron durante la época estival, efectuando tanto la siembra, como la cosecha de las plantas, entre uno y dos meses mas tarde que a campo (entre diciembre y mayo/junio), debido a que las condiciones ambientales dentro del invernadero, permiten extenderse en el tiempo.

1.1. Primer ensayo de invernadero: 2017/18

Se utilizaron 12 macetas de 25 cm de diámetro y 22 cm de profundidad (0.011m^3) en cada tratamiento, para evaluar parámetros de crecimiento y 16 macetas de 27 x 27 cm de superficie y 29 cm profundidad (0.021m^3), de cada tratamiento, para medir parámetros de rendimiento y de la enfermedad, con un diseño completamente aleatorizado en ambos casos (Figura 16). La siembra se realizó con condiciones de humedad adecuada (suelo friable), a una profundidad de 5 cm, colocando seis semillas por maceta, dejando posteriormente dos plantas en cada una. Dentro del invernadero se mantuvieron temperaturas entre 20 y 36 °C y las macetas fueron regadas periódicamente, para mantener la tierra húmeda para un correcto desarrollo y crecimiento de las plantas. Los tratamientos en ambos tipos de maceta fueron cuatro, todos dirigidos a las semillas: **T**: inoculación con la suspensión de *T. harzianum* ITEM 3636, **P**: inoculación con *P. putida* RC-93, **TP**: coinóculo de ambos microorganismos y **C**: control, con agua destilada estéril. La concentración de todos los microorganismos aplicados, fue 5×10^6 conidios/UFC por ml.



Figura 16: Disposición de las macetas en el ensayo en invernadero 2017/18.

VARIABLES ANALIZADAS

Emergencia: A los 18 días después de la siembra (DDS), se contó el número de plántulas emergidas en todas las macetas.

Crecimiento: A los 75 DDS (estadio R2), se sacaron cuidadosamente las plantas de las macetas (de 0.011m^3), para preservar tanto las raíces como la parte aérea. A cada planta se le midió: altura, peso fresco y peso seco de la parte aérea, longitud, volumen, peso fresco y peso seco de raíces. También se determinó el contenido de nitrógeno (N_2) de cinco plantas por tratamiento mediante el método de Kjeldahl (Romero, 1997), en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. La altura de las plantas se midió sobre el eje principal, hasta el último nudo con hoja desplegada. Para determinar la longitud de raíces, se tomó el largo hasta donde llegaban los ápices de al menos tres raíces; mientras que para el volumen de las mismas, las plantas fueron cortadas a la altura del cuello y se sumergió la parte radical en una probeta con agua y se registró cuanto se desplazaba la columna de agua, arrojando un valor de cm^3 de raíces (1 ml equivale a 1 cm^3). Los pesos se tomaron en húmedo, y posteriormente se secaron en estufa de aire forzado, dentro de sobres de papel por tres días a 60°C , para pesar la parte aérea y radical seca (Figura 17).

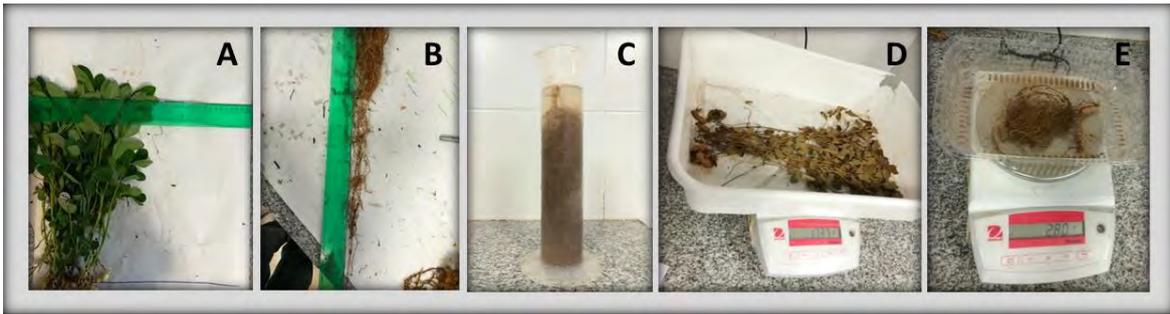


Figura 17: Medición de parámetros de crecimiento. A: altura de la planta. B: largo de las raíces. C: volumen de raíces. D: peso seco de parte aérea. E: de peso seco de raíces.

Rendimiento: A los 140 DDS (R7-R8), se arrancaron las plantas de las macetas, se cosecharon las vainas y se colocaron en bolsas de papel que se llevaron a estufa de aire forzado por tres días a 60°C, hasta conseguir una humedad estable (9%). Posteriormente se pesaron las vainas, granos y granos calidad confitería (tamaño superior a zaranda de tajo de 7,5mm).

1.2. Segundo ensayo de invernadero: 2018/19

Utilizando las macetas y la metodología de siembra antes descritas, y manteniendo las condiciones dentro del invernadero, se llevaron a cabo dos experiencias, con diferentes objetivos.

Por un lado, se realizó un ensayo en macetas de 0.011m³ en un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones, donde los tratamientos fueron dos: **P**: inoculación con *P. putida* RC-93 a las semillas y **C**: control, con agua destilada estéril. La finalidad del mismo, fue estudiar si los resultados de crecimiento de las plantas eran coincidentes con los del año previo.

Por otro lado, con las macetas mas grandes (0.021m³) se siguió el mismo diseño, con 15 repeticiones por tratamiento (Figura 19), que en este caso fueron cinco: **Ct**: control total, **C**: control con patógeno, **T**: semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, **Pr**: plantas regadas con la suspensión de *P. putida* RC-93 y **Pf**: plantas asperjadas con *P. putida* RC-93. En todos los casos salvo en Ct, las plantas fueron asperjadas con el patógeno. Para todas las aplicaciones foliares (*P. putida* RC-93, patógeno o agua destilada), se atomizaron 40 ml por planta, con un aspersor manual, y en todos los casos con el agregado de Tween 20 al 1 % para favorecer la adhesión a las hojas. Por otro lado, para el tratamiento de Pr se regó con 100 ml de la suspensión y en el resto de los tratamientos, 100 ml de agua

destilada estéril. Las concentraciones de microorganismos aplicadas fueron: patógeno: 2×10^4 conidios/ml; *T. harzianum* ITEM 3636 5×10^6 ; *P. putida* RC-93 foliar 1×10^8 ufc/ml; *P. putida* RC-93 riego: 5×10^6 ufc/ml.

Para la obtención del inóculo de *N. personata*, se colectaron folíolos de un cultivo de maní severamente afectado por el patógeno, se lavaron en agua corriente y se colocaron aproximadamente 30 folíolos cada 100 ml de agua, con 1% de tween 20, y se colocaron en agitación por tres horas a 120 rpm (Figura 18). Luego se cuantificó la concentración de conidios al microscopio, utilizando una cámara de Neubauer, arrojando aproximadamente 2×10^4 conidios/ml; esa fue la concentración máxima que se pudo lograr, con la cual se efectuó el asperjado de las plantas.



Figura 18: Obtención de conidios de *Nothopassalora personata* desde hojas de maní enfermas.

A los 130 DDS (R5-R6), se procedió con las aplicaciones foliares y por riego, de la manera en que se detalla a continuación: se asperjó con 40 ml de la suspensión de RC-93 1×10^8 (Pf) o con agua destilada estéril (resto de los tratamientos). Al mismo tiempo se regaron todas las macetas con 100 ml de agua destilada estéril o con la suspensión de RC-93 5×10^6 (Pr). Aproximadamente cinco horas después, se asperjó con 40 ml de agua destilada estéril (Ct) o con la suspensión del patógeno 2×10^4 (los otros cuatro tratamientos) y las plantas fueron cubiertas por un lapso de cinco días, con bolsas de nylon transparente para mantener la humedad y así favorecer la infección.



Figura 19: Disposición de las macetas en el ensayo en invernadero 2018/19.

Variables analizadas

Emergencia: A los 25 DDS, se cuantificó la emergencia de las plántulas.

Crecimiento: A los 74 DDS (R2), se extrajeron cuidadosamente las plantas de las macetas (0.011m^3) para realizar las determinaciones de los parámetros: altura de la planta, longitud y volumen de raíces, peso fresco y seco de parte aérea y de raíces, del mismo modo que el año previo.

Intensidad de la enfermedad: A los 50 días de la inoculación con el patógeno (R8), se tomó una rama lateral de una planta de cada maceta (0.021m^3) y se cuantificó la intensidad de la enfermedad a través de los parámetros: número de folíolos enfermos (con síntomas), incidencia (porcentaje de folíolos afectados) y severidad, calculada a partir de la fórmula propuesta por Plaut y Berger (1980): $ST = ((1-D) * Sx) + D$; donde ST: severidad total, D: defoliación y Sx: severidad promedio calculada a partir de una escala diagramática de severidad (Figura 20), propuesta por Shokes *et al.* (1987).

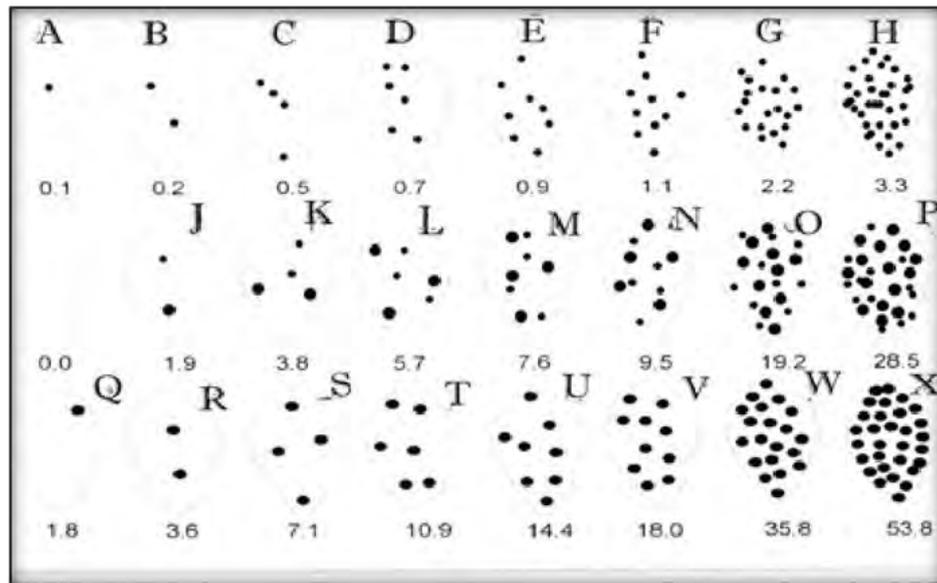


Figura 20: Escala diagramática de severidad de viruela del maní propuesta por Shokes *et al.* (1987).

Rendimiento: A los 180 DDS (R8), se procedió con la cosecha de las plantas de las macetas (0.021m^3), separando las vainas del resto de la planta, y dejándolas secar dentro de bolsas de papel en estufa de aire forzado a 50°C hasta conseguir una humedad estable (9%). Posteriormente, se pesaron las vainas, se descascararon para pesar los granos totales y, finalmente, los granos de calidad confitería.

1.3. Tercer ensayo de invernadero: 2019/20

Se realizó el tratamiento a las semillas, la siembra, y se mantuvo el ensayo por alrededor de dos meses, de la misma manera que en los años previos; pero finalmente se decidió discontinuarlo, debido a las complicaciones inherentes a la cuarentena.

Se emplearon 10 macetas de (0.021m^3) por tratamiento, distribuidos en un diseño completamente aleatorizado (Figura 21), donde los tratamientos contemplados fueron siete: **Ct**: control total, **C**: control con patógeno, **T**: semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, **P**: semillas inoculadas con *P. putida* RC-93, **TP**: semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636 y *P. putida* RC-93, **Pr**: plantas regadas con la suspensión de *P. putida* RC-93 y **Pf**: plantas asperjadas con el inóculo bacteriano. En todos los casos salvo en Ct, las plantas serían asperjadas con el patógeno.



Figura 21: Disposición de las macetas en el ensayo en invernadero 2019/20.

Solo se llegó a medir la emergencia a los 17 DDS. Como los tratamientos Ct, C, Pr y Pf eran idénticos hasta ese momento para las semillas (solamente curadas con fungicida químico, mas el agregado de CMC 2% y agua destilada estéril), se tomaron como controles (C), y se compararon con T, P y TP. No se pudo evaluar el resto de las variables como en los otros años por el tiempo que se pudo mantener el ensayo.

1.4. Cuarto ensayo de invernadero: 2020/21

Se trabajó de igual manera que en el año previo, con el mismo diseño y número de repeticiones, solo que esta vez se trabajó en las macetas más chicas (0.011m^3) por practicidad en el desarrollo del experimento y por un mejor uso del espacio físico (Figura 22). Se pudieron realizar los siete tratamientos antes contemplados: **Ct**: control total, **C**: control con patógeno, **T**: semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, **P**: semillas inoculadas con *P. putida* RC-93, **TP**: semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636 y *P. putida* RC-93, **Pr**: plantas regadas con la suspensión de *P. putida* RC-93 y **Pf**: plantas asperjadas con el inóculo bacteriano. En todos los casos salvo en Ct, las plantas fueron asperjadas con el inóculo bacteriano (*N. personata*).

Para todas las aplicaciones foliares (*P. putida* RC-93 foliar, patógeno o agua destilada), se atomizaron 40 mililitros por planta, con un aspersor manual, y en todos los casos con el

agregado de Tween 20 al 1 % para favorecer la adhesión a las hojas; mientras que para el tratamiento de *Pseudomonas* sp. RC-93 por riego se aplicaron 100 ml de la suspensión y 100 ml de agua destilada estéril en el resto de los tratamientos. Las concentraciones de microorganismos aplicadas fueron: patógeno: 1×10^3 conidios/ml; *T. harzianum* ITEM 3636 5×10^6 ; *P. putida* RC-93 foliar 1×10^8 UFC/ml; *P. putida* RC-93 riego y en semillas: 5×10^6 UFC/ml.

Para la obtención del inóculo de *N. personata*, se siguió el procedimiento empleado en el segundo ensayo de invernadero (2018/19), pero la concentración obtenida fue inferior a la esperada, alrededor de 1×10^3 conidios/ml, incluso cuando los tiempos de agitado fueron mayores que para el caso anterior, posiblemente debido a una menor intensidad de la enfermedad en las hojas colectadas para la preparación del inóculo.

A los 60 DDS (R2), se procedió con estos tratamientos y la inoculación con el patógeno de la manera en que se detalla a continuación: se asperjó con 40 ml la suspensión de *Pseudomonas* 1×10^8 (Pf) o con agua destilada estéril (resto de los tratamientos). Al mismo tiempo se regaron todas las macetas con 100 ml de agua destilada estéril o con la suspensión de *Pseudomonas* 5×10^6 (Pr). Unas horas después, se asperjó con 40 ml de agua destilada estéril (Ct) o con la suspensión del patógeno 1×10^3 (los otros seis tratamientos). Las plantas no se cubrieron con bolsas de nylon debido a que la temperatura esos días fue baja y se mantuvo una adecuada humedad en el ambiente.



Figura 22: Disposición de macetas en ensayo en invernadero 2020/21.

Variables analizadas

Emergencia: A los 17 DDS, se cuantificó la emergencia de las plántulas, donde los tratamientos evaluados fueron los mismos que en el ensayo anterior, C (compuesto por las macetas de los tratamientos Ct, C, Pr y Pf), T, P y TP, con 40 repeticiones en el primer caso y 10 en los otros tres.

Intensidad de la enfermedad: A los 60 días de la inoculación con el patógeno (DDI) (R7-R8), se tomaron cuatro ramas por maceta (tres laterales y un eje central) y se cuantificó la intensidad de la enfermedad a través del número de folíolos enfermos, la incidencia y la severidad, calculada a partir de la fórmula propuesta por Plaut y Berger (1980). Los cuatro valores de cada maceta se promediaron para tener un solo valor representativo por repetición.

Rendimiento: A los 120 DDS (R7-R8), se procedió a la cosecha de las plantas, bajo condiciones de suelo friable, separando las vainas del resto de la planta, secando las mismas dentro de bolsas de papel en estufa de aire forzado hasta conseguir una humedad estable (9%). Posteriormente se pesaron las vainas, se descascararon para pesar los granos totales y finalmente, los granos de calidad confitería, previo paso por zaranda de tajo de 7,5mm.

2. RESULTADOS

2.1. Primer ensayo de invernadero: 2017/18

Cuando se analizó la emergencia de plántulas según los distintos tratamientos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los ensayos, por lo tanto se agruparon los resultados (n=28) y se presentan de manera conjunta (Tabla 3).

Tabla 3: Emergencia de plantas de maní sometidas a aplicación de bioformulados en la semilla, ensayo invernadero 2017/18

Tratamiento	Repeticiones	Emergencia (%)
C	28	42,86 ± 5,87 a
T	28	45,54 ± 5,61 a
P	28	40,18 ± 4,33 a
TP	28	39,29 ± 5,05 a

Valores expresados en porcentaje ± error estándar. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Al evaluar los parámetros de crecimiento: altura de la planta, longitud y volumen de raíces, peso fresco y seco de parte aérea y de raíces y contenido de nitrógeno, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar todos los tratamientos (Tabla 4).

Tabla 4: Parámetros de crecimiento de las plantas de maní según tratamiento a la semilla con los diferentes bioformulados, ensayo invernadero 2017/18

Trat.	Altura P	Long R	PF R	PF A
C	38,51 ± 1,24 a	47,71 ± 4,64 a	17,18 ± 1,28 a	120,36 ± 6,83 a
P	40,14 ± 1,61 a	44,01 ± 2,37 a	19,96 ± 1,39 a	121,46 ± 6,49 a
T	38,52 ± 1,29 a	50,15 ± 3,45 a	16,10 ± 1,07 a	114,56 ± 7,04 a
TP	42,24 ± 1,28 a	48,57 ± 3,70 a	16,12 ± 2,34 a	116,68 ± 5,81 a

Trat.	PS R	PS A	Vol R	Cont N
C	2,81 ± 0,17 a	23,93 ± 1,23 a	18,13 ± 1,30 a	1,93 ± 0,23 a
P	3,60 ± 0,23 a	26,05 ± 2,00 a	22,40 ± 1,37 a	1,92 ± 0,15 a
T	2,76 ± 0,15 a	21,89 ± 1,08 a	18,85 ± 1,47 a	1,71 ± 0,09 a
TP	2,93 ± 0,39 a	24,94 ± 2,11 a	20,31 ± 2,45 a	2,21 ± 0,14 a

Altura P: altura de plantas. Long R: longitud de raíces (cm). PF R: peso fresco de raíces (gr). PF A: peso fresco aéreo (gr). PS R: peso seco de raíces (gr). PS A: peso seco aéreo (gr). Vol R: volumen de raíces (cm³). Cont N: contenido de nitrógeno (% en base seca). Valores por maceta (± error estándar), salvo contenido de nitrógeno. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

IV. OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Cuando se analizaron todos estos parámetros, comparando los tratamientos de a pares, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en aquellas plantas cuyas semillas fueron tratadas con *P. putida* RC-93, respecto a las del tratamiento control, teniendo las primeras un mayor volumen y peso seco de raíces. Por otro lado, las tratadas con el coínóculo, mostraron una mayor altura de las plantas que las plantas control (Figura 23).

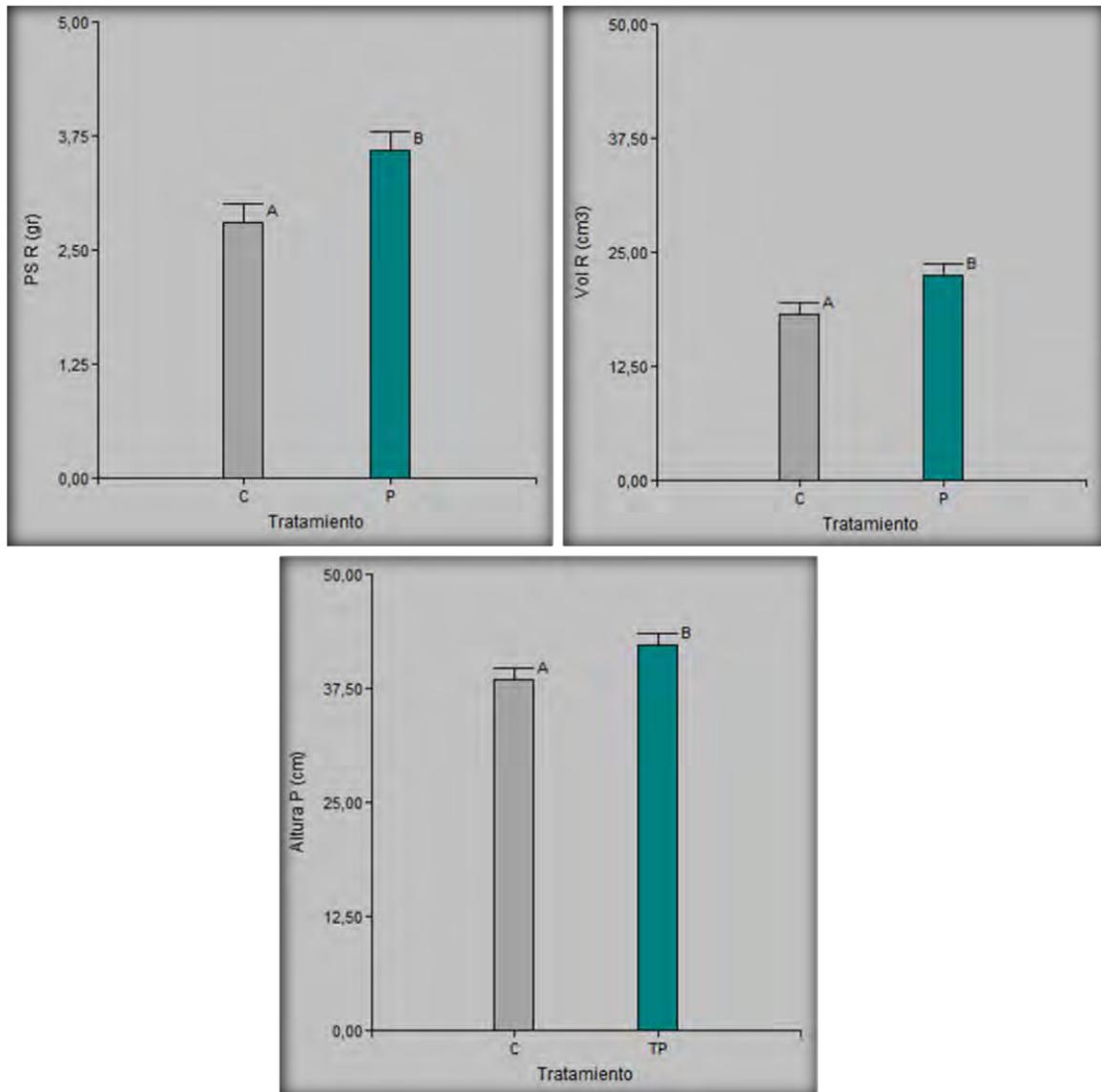


Figura 23: Variables de crecimiento de plantas de maní según el tratamiento a la semilla con los diferentes bioformulados, ensayo invernadero 2017-2018. PS R (gr): peso seco de raíces. Vol R (cm³): volumen de raíces. Altura P (cm): altura de planta. C: control. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 + RC-93. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Por otro lado, al analizar las variables productivas: rendimiento en vainas, granos y granos calidad confitería, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5: Rendimiento (Rto) de maní en vainas, granos y granos calidad confitería según el tratamiento a las semillas con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2017/18

Tratamiento	Rto en vainas	Rto en granos	Rto en granos confitería
C	59,10 ± 3,77 a	43,04 ± 3,08 a	31,59 ± 3,33 a
T	58,14 ± 4,09 a	42,54 ± 3,03 a	32,93 ± 3,05 a
P	54,91 ± 4,82 a	41,05 ± 3,72 a	28,89 ± 3,62 a
TP	51,32 ± 5,07 a	37,07 ± 3,99 a	27,14 ± 3,83 a

Valores expresados en gr/maceta ± error estándar. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.2. Segundo ensayo de invernadero: 2018/19

Cuando se analizó el porcentaje de emergencia en las macetas mas chicas (P y C), la media para el tratamiento con *P. putida* RC-93 fue de 61.11%, mientras que para el control 55.56%, pero sin diferencias estadísticamente significativas. Para el caso del ensayo en las otras macetas (T y C), las semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636 (T) presentaron valores de emergencia media más altos (65,56%), pero la diferencia con C (62,92%) no fue significativa. Al mismo tiempo, se compararon los porcentajes de emergencia de ambos ensayos, para tener un mayor número de controles y poder comparar también T y P, debido a que las condiciones hasta ese momento eran las mismas para los tres tratamientos. En este caso, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 6: Emergencia de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2018/19

Tratamiento	Repeticiones	Emergencia (%)
C	72	61,22 ± 2,88 a
T	15	65,56 ± 4,22 a
P	12	61,11 ± 5,56 a

Valores expresados en porcentaje ± error estándar. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

En cuanto a las variables de crecimiento (Tabla 7 y Figura 24), las únicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (C y P), fueron el peso fresco de las raíces y el volumen de las mismas, encontrando que cuando las semillas fueron

inoculadas con la suspensión de *P. putida* RC-93, estos parámetros aumentaron; por otro lado, el peso seco de las raíces también tuvo valores más altos, pero sin diferencias significativas (Figura 24). Estos resultados coinciden en gran medida con los obtenidos en el ensayo del año anterior.

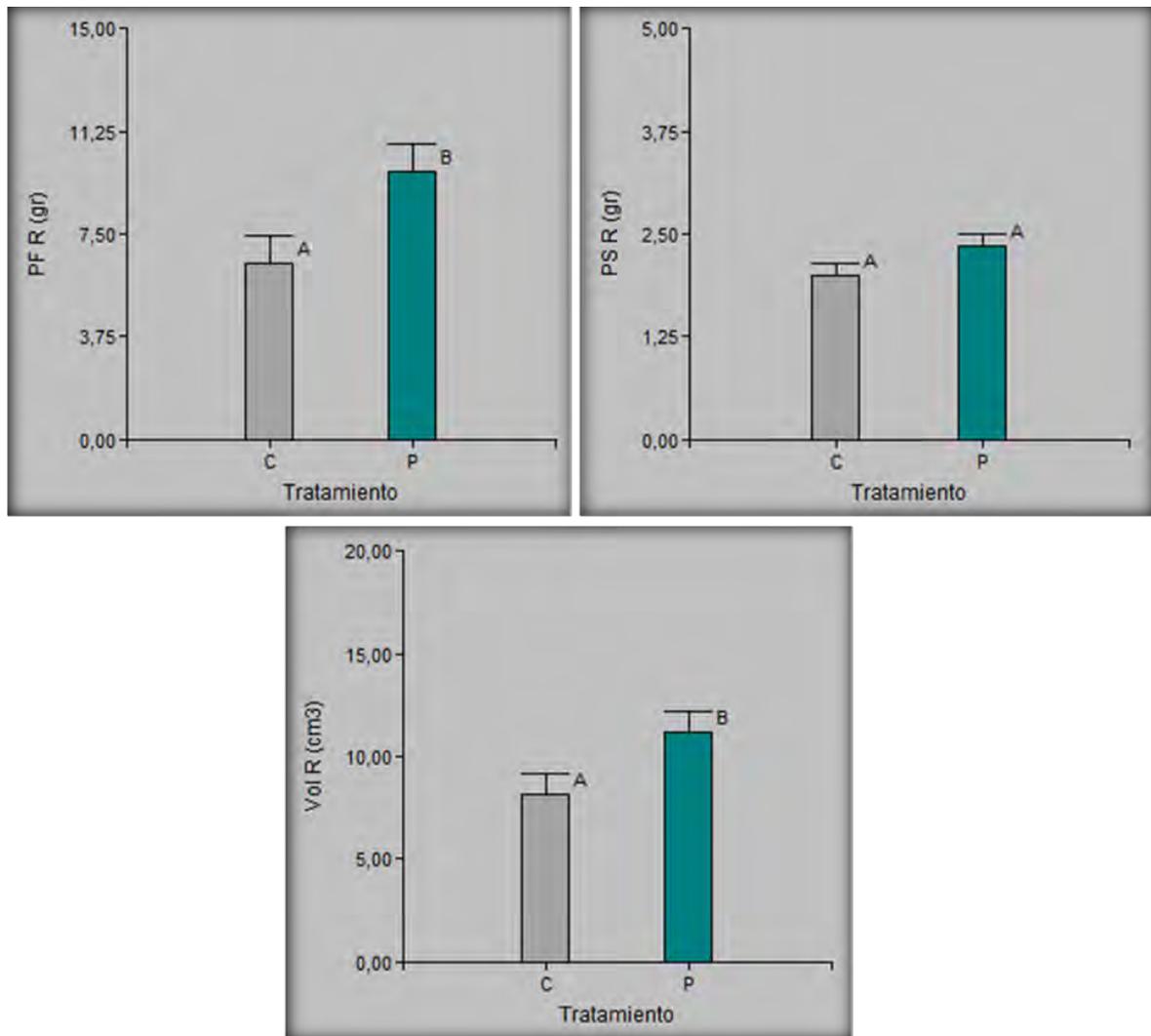


Figura 24: Variables de crecimiento de plantas de maní según el tratamiento a la semilla con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2018-2019. C: control. P: *Pseudomonas putida* RC-93. PF R (gr): peso fresco/húmedo de raíces. PS R (gr): peso seco de raíces. Vol R (cm³): volumen de raíces. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Tabla 7: Parámetros de crecimiento de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2018/19

Trat.	Altura P	Long R	PF A	PS A
C	33,42 ± 1,06 a	39,03 ± 3,01 a	84,15 ± 3,32 a	16,06 ± 0,61 a
P	33,83 ± 0,65 a	38,04 ± 1,47 a	81,89 ± 3,61 a	16,51 ± 0,83 a

Altura P: altura de las plantas (cm). Long R: longitud de raíces (cm). PF A: peso fresco aéreo (gr). PS A: peso seco aéreo (gr). Valores por maceta ± error estándar. C: control. P: *Pseudomonas putida* RC-93. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

En el segundo año de ensayos en invernadero, se pudo inocular a las plantas con el patógeno (*N. personata*) realizando las estimaciones correspondientes de la intensidad de la enfermedad. Al comparar tratamientos por su respuesta frente a viruela tardía, se encontró que aquellos en los que se había aplicado alguno de los biocontroladores, ya sea en las semillas (T), como por riego (Pr) o aspersión (Pf), la enfermedad se presentó con menor intensidad que en el control, al que solo se le aplicó agua (Figura 25).

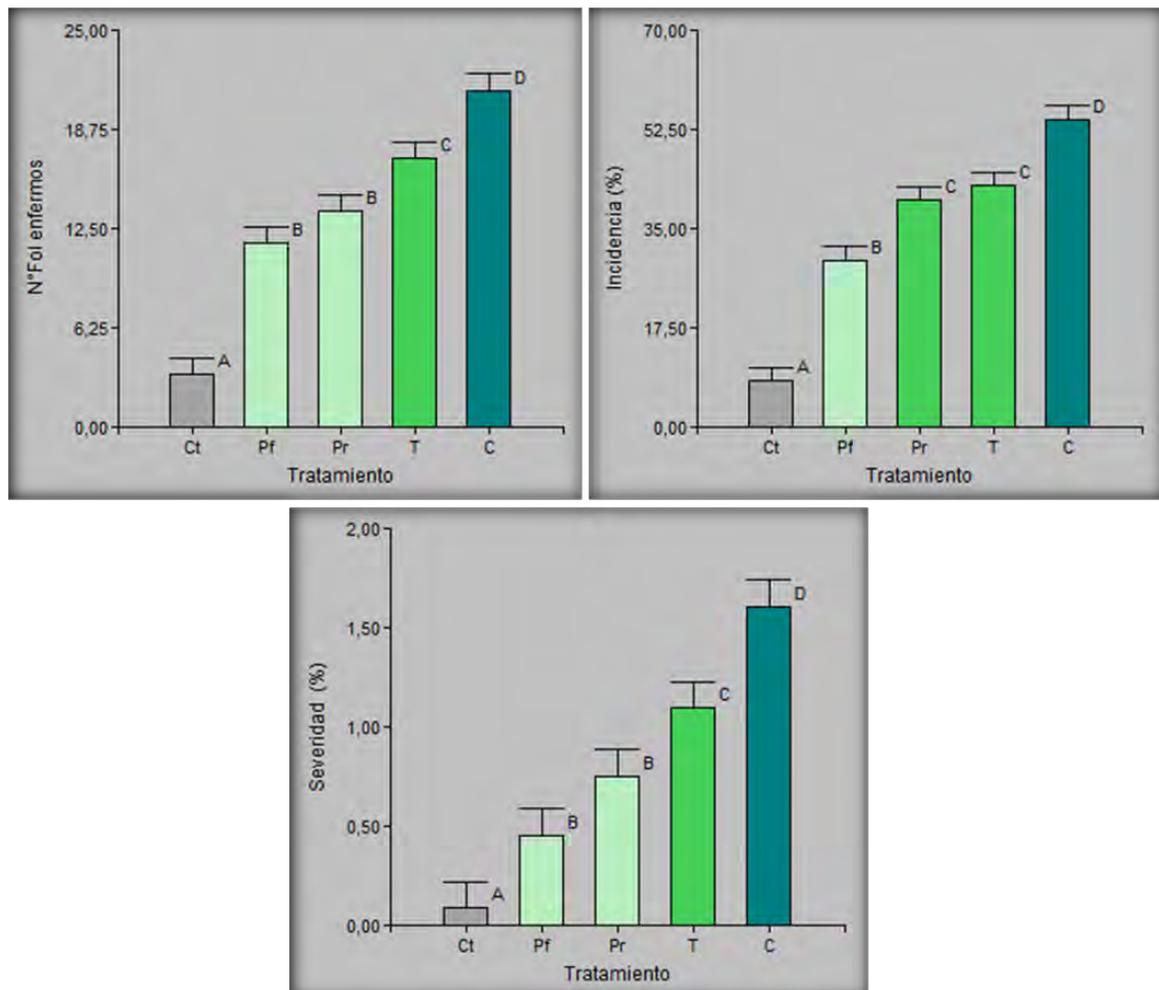


Figura 25: Intensidad de viruela tardía (*Nothopassalora personata*), según los tratamientos realizados con bioformulados, ensayo de invernadero 2018/19. Ct: control total. Pf: *Pseudomonas putida* RC- 93 foliar. Pr: *P. putida* RC-93 por riego. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. C: control con patógeno. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

En las plantas que no fueron inoculadas con el patógeno (Ct), se encontraron muy pocas manchas de viruela, quizás por inóculo proveniente de otra fuente, o de salpicadura de agua de riego desde las plantas inoculadas, más allá de que estaban distanciadas. En el tratamiento C, que no recibió la aplicación de ninguno de los microorganismos

biocontroladores, el número de folíolos afectados, la incidencia y la severidad de la enfermedad fueron significativamente mayores que en las plantas tratadas. Entre T, Pr y Pf, se encontró que los tratamientos con *P. putida* RC- 93 tuvieron un menor número de folíolos afectados y menor severidad que las tratadas con *T. harzianum* ITEM 3636, a su vez la incidencia de la enfermedad, presentó su menor valor medio en el tratamiento Pf.

Por último, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados, respecto al rendimiento en vainas, granos y granos calidad confitería (Tabla 8).

Tabla 8: Rendimiento (Rto) de maní en vainas, granos y granos calidad confitería según el tratamiento con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2018/19

Tratamiento	Rto en vainas	Rto en granos	Rto en granos confitería
Ct	51,52 ± 4,47 a	40,01 ± 3,71 a	32,14 ± 3,71 a
C	53,28 ± 4,00 a	40,92 ± 3,21 a	32,65 ± 2,68 a
T	44,78 ± 1,08 a	34,11 ± 0,96 a	27,91 ± 1,29 a
Pr	49,35 ± 4,17 a	37,28 ± 3,67 a	30,99 ± 3,84 a
Pf	48,99 ± 1,28 a	37,11 ± 0,95 a	30,80 ± 0,72 a

Valores expresados en gr/maceta ± error estándar. Ct: control total. Pf: *Pseudomonas putida* RC- 93 foliar. Pr: *P. putida* RC-93 por riego. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. C: control con patógeno. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.3. Tercer ensayo de invernadero: 2019/20

Cuando se analizó la emergencia de plántulas a los 17 DDS, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 9), tal como se observó en los anteriores ensayos.

Tabla 9: Emergencia de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2019-2020

Tratamiento	Repeticiones	Emergencia (%)
C	40	52,08 ± 3,11 a
T	10	48,32 ± 4,61 a
P	10	59,99 ± 6,19 a
TP	10	46,66 ± 4,84 a

Valores expresados en porcentaje ± error estándar. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.4. Cuarto ensayo de invernadero: 2020/21

La emergencia en invernadero a los 17 DDS no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro tratamientos evaluados (Tabla 10), tal como se observó en los tres años anteriores; lo cual indica que no hubo una mejora en la germinación con el agregado de los microorganismos en las semillas, pero tampoco se perjudicó la emergencia de las plántulas.

Tabla 10: Emergencia de plantas de maní según el tratamiento con bioformulados a la semilla, ensayo invernadero 2020/21

Tratamiento	Repeticiones	Emergencia (%)
C	40	61,24 ± 3,70 a
T	10	56,66 ± 7,11 a
P	10	66,66 ± 7,45 a
TP	10	70,00 ± 7,78 a

Valores en porcentaje ± error estándar. C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. P: *Pseudomonas putida* RC-93. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Respecto a la intensidad de la enfermedad, en primer lugar se destaca la baja cantidad de folíolos enfermos por *N. personata* lograda en el presente ensayo, que pese a que normalmente es mucho menor que la observada a campo, también fue inferior a las logradas en el ensayo 2018/19, debido a la menor concentración de inóculo del patógeno que se pudo obtener. Sin embargo, se observaron diferencias entre los tratamientos para las tres variables evaluadas, encontrando que el control con patógeno (C), tuvo los mayores registros de la enfermedad (Figuras 26 a 28). Lo observado coincide con lo del anterior ensayo en que se pudo evaluar la enfermedad (2018/19), con el mismo comportamiento para los tratamientos que se repitieron (C, T, Pr y Pf), a los que se les agregaron *P. putida* RC-93 y el coinóculo a la semilla.

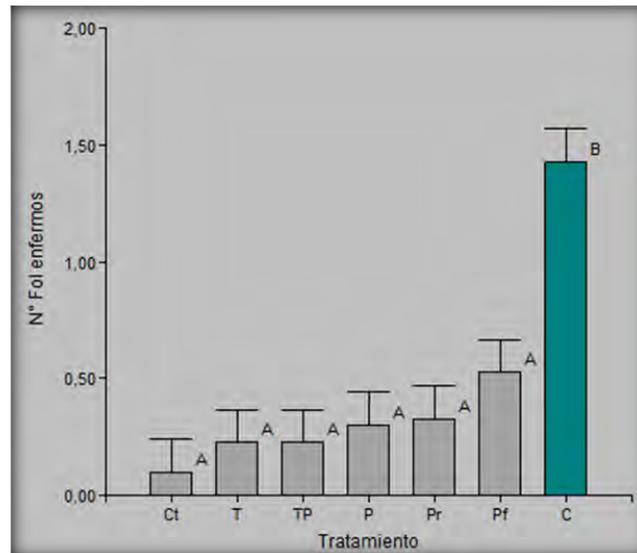


Figura 26: Número de foliolos enfermos por maceta según tratamiento con bioformulados, ensayo de invernadero 2020-2021. Ct: control total. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. P: *Pseudomonas putida* RC-93 en semilla. TP: coinóculo en semilla. Pr: *P. putida* RC-93 por riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. C: control con patógeno. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

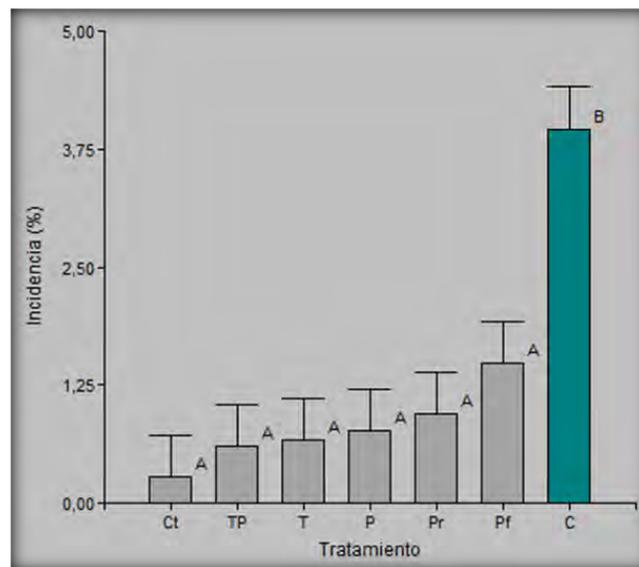


Figura 27: Incidencia de viruela tardía (% por maceta) según tratamiento con bioformulados, ensayo de invernadero 2020-2021. Ct: control total. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. P: *Pseudomonas putida* RC-93 en semilla. TP: coinóculo en semilla. Pr: *P. putida* RC-93 por riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. C: control con patógeno. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

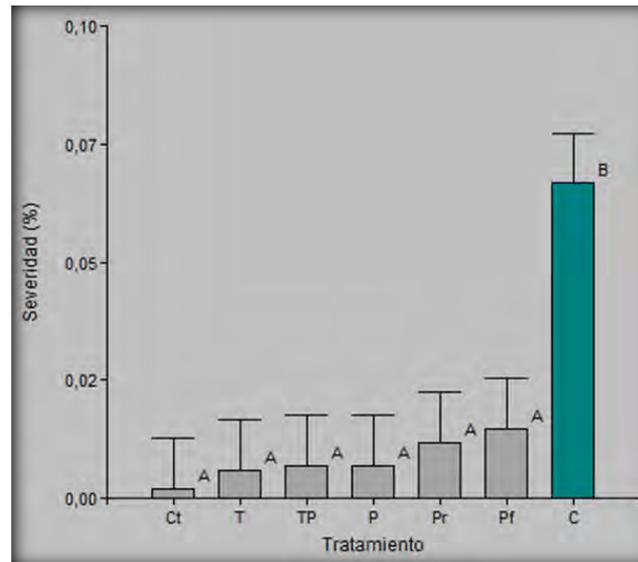


Figura 28: Severidad de viruela tardía (% por maceta) según tratamiento con bioformulados, ensayo de invernadero 2020-2021. Ct: control total. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. P: *Pseudomonas putida* RC-93 en semilla. TP: coinóculo en semilla. Pr: *P. putida* RC-93 por riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. C: control con patógeno. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

En cuanto a las variables productivas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Tabla 11), lo cual coincide con lo observado en los anteriores ensayos de invernadero: C y T estuvieron presentes en todos los ensayos (tuvieron tres réplicas), mientras que P y TP en el primero y Pr y Pf en el segundo, siendo la presente, su segunda réplica.

Tabla 11: Rendimiento (Rto) de maní en vainas, granos y granos calidad confitería según el tratamiento con los diferentes bioformulados, ensayo de invernadero 2020/21

Tratamiento	Rto en Vainas	Rto en Granos	Rto en granos confitería
Ct	8,60 ± 1,09 a	4,27 ± 0,67 a	0,60 ± 0,19 a
C	9,76 ± 1,24 a	5,80 ± 0,75 a	1,41 ± 0,35 a
T	12,30 ± 1,23 a	6,57 ± 0,87 a	1,84 ± 0,71 a
P	10,25 ± 0,49 a	4,99 ± 0,36 a	1,55 ± 0,23 a
TP	9,36 ± 0,79 a	4,50 ± 0,61 a	1,15 ± 0,22 a
Pr	8,90 ± 0,54 a	4,32 ± 0,33 a	1,25 ± 0,23 a
Pf	7,80 ± 1,44 a	3,94 ± 0,91 a	1,43 ± 0,46 a

Ct: control total. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. P: *Pseudomonas putida* RC-93 en semilla. TP: coinóculo en semilla. Pr: *P. putida* RC-93 por riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. C: control. Valores en gr/maceta ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

3. DISCUSIÓN

Según lo observado en los diferentes ensayos realizados en invernadero, la aplicación de los distintos bioformulados en las semillas, no generó problemas en la emergencia de las plantas, lo que se correlaciona con lo expresado en la sección anterior, en la evaluación de la germinación en condiciones de laboratorio. Estos resultados, coinciden con lo encontrado previamente por nuestro grupo de investigación tanto en condiciones de invernadero (Rojo *et al.*, 2007), como a campo (Ganuza *et al.*, 2018), en que se usaron las mismas concentraciones del bioformulado a base de *T. harzianum* ITEM 3636 para la inoculación de semillas de maní, sin observar un perjuicio en la emergencia, pero tampoco una mejora en la misma. Respecto a la aplicación de la cepa bacteriana, donde se encontraron los mismos resultados, estaría sugiriendo que la concentración empleada fue baja (10^6 UFC), respecto a otros trabajos (alrededor de 10^9 UFC) (Pastor *et al.*, 2016; Anzuay *et al.*, 2017), sin embargo, en ellos tampoco se reportaron incrementos en la germinación o emergencia de plántulas.

En lo que respecta al crecimiento, para la mayoría de las variables evaluadas no se encontraron diferencias, a excepción de la altura de las plantas, que se vio favorecida con la aplicación del coinóculo (*T. harzianum* ITEM 3636 + *P. putida* RC-93) respecto al control en el primer año. Sin embargo, es importante aclarar que este parámetro no tiene demasiada importancia para este cultivo, motivo por el cual no se encuentra información bibliográfica. Otro parámetro en el que se registraron diferencias, fue el volumen y peso de las raíces en los dos años en que se evaluaron; se registraron valores más altos con la aplicación de *P. putida* RC-93 respecto al control. Resultados similares fueron informados por Pastor *et al.* (2016) en plantas de tomate, y por Anzuay *et al.* (2017), Prasad y Babu (2017) y Gupta *et al.* (2020) en plantas de maní, donde registraron un mayor crecimiento de raíces luego de su inoculación con *Pseudomonas*. El mayor desarrollo del sistema radical suele atribuirse a una mayor producción de ácido indol acético por algunas bacterias PGPR (Vacheron *et al.*, 2013). Por otro lado, respecto a *Trichoderma*, Pelagio-Flores *et al.* (2017) reportaron que *T. atroviride* promovió el crecimiento de raíces laterales en arabidópsis en etapas tempranas, pero posteriormente generó un acortamiento y reorientación de la raíz principal, como resultado de la acidificación del medio. El peso y volumen de raíces no son un determinante directo del rendimiento del cultivo, sin embargo, permiten que las plantas tengan una mejor absorción de agua y nutrientes durante su

crecimiento, principalmente ante estrés hídrico (Junjittakarn *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021).

Normalmente, los niveles de enfermedad que se consiguen en invernadero, son mucho más bajos que los observados a campo, sin embargo, permiten hacer evaluaciones muy interesantes. La intensidad lograda de viruela tardía (segundo y cuarto ensayo), en los tres parámetros evaluados, número de folíolos enfermos, incidencia y severidad, permitió encontrar diferencias entre los tratamientos. Se observó que la aplicación de los bioformulados a base de *T. harzianum* ITEM 3636, *P. putida* RC-93 y el coinóculo, permitió disminuir la intensidad de los síntomas. Esto fue más evidente en el segundo ensayo de invernadero (2018-2019), donde se lograron niveles de enfermedad más altos, y se pudieron observar más claramente las diferencias entre tratamientos, encontrando incluso, que *P. putida* RC-93 mediante aplicación foliar o por riego, permitió llegar a niveles de intensidad de la enfermedad más bajos que *T. harzianum* ITEM 3636 aplicado a las semillas. En ese año, la concentración lograda en la suspensión de conidios de *N. personata*, fue más alta, y del mismo orden que la empleada en otros ensayos (Kishore *et al.*, 2005a,b; Anil y Podile *et al.*, 2012). En nuestro grupo de investigación, se viene trabajando hace más de una década con *T. harzianum* ITEM 3636 (Rojo *et al.*, 2007); y en el último trabajo publicado (Erazo *et al.*, 2021), se encontró una menor intensidad de podredumbre parda de la raíz del maní (*Fusarium solani*) en ensayos de invernadero, siendo los mecanismos responsables del biocontrol, el micoparasitismo y la antibiosis. Sin embargo, para el caso de una enfermedad foliar como es viruela, y si la aplicación del bioformulado es en la semilla, como se planteó para la mayoría de los tratamientos, básicamente los que contemplaron a *T. harzianum* ITEM 3636, se espera que si hay un efecto biocontrolador, este sea por resistencia inducida, debido a la distancia espacial entre el hongo patógeno y el potencial biocontrolador (Tseng *et al.*, 2020). Otra manera de evaluar si hay respuesta tipo ISR, es mediante la cuantificación de compuestos como proteínas relacionadas con la patogénesis y enzimas de defensa, que pueden modificarse tras la inoculación con un ACB y generar un efecto priming al enfrentar la planta con el patógeno. Con respecto a *Pseudomonas*, hay antecedentes en que utilizan cepas frente a *N. personata*, donde aplican de manera foliar (Kishore *et al.*, 2005b), o foliar y a la semilla (Meena *et al.*, 2002), con resultados que concuerdan con lo encontrado en estos ensayos; en el primero de ellos a su vez, apuntan a la resistencia sistémica inducida como un

importante mecanismo de biocontrol, en concordancia con lo reportado por Pastor *et al.* (2016) en otro patosistema.

En cuanto al rendimiento, no se encontró un aumento en ninguno de los parámetros evaluados durante los tres años de ensayo, incluso en aquellos en que se pudieron enfermar las plantas, y encontrar a su vez, diferencias en la intensidad de viruela tardía. Al respecto, se debe considerar que la severidad de la enfermedad estuvo muy por debajo del nivel de daño económico (10-13%) (Capiello *et al.*, 2012), y más aún de los valores de defoliación reportados por Anco *et al.* (2020a) para llegar a tener pérdidas significativas (alrededor de 25 %). Por otra parte, no se encontró una promoción del rendimiento del maní en las condiciones evaluadas; muchos de los trabajos previamente citados no reportan aumentos de rendimiento con el uso de ACB. Kishore *et al.* (2005a) por su parte, mencionan un mayor rendimiento en vainas luego de la aplicación foliar de diferentes cepas bacterianas frente a *N. personata*. Sin embargo, es conocido el efecto de diferentes PGPR y cepas fúngicas, por incrementar el crecimiento de las plantas y su rendimiento, de manera directa o indirecta (El-Katatny e Idres, 2014; Figueredo *et al.*, 2017; Ganuza *et al.*, 2018).

La inoculación de semillas de maní con *T. harzianum* ITEM 3636 o *P. putida* RC-93, no generó perjuicios en la germinación de las plantas en los ensayos de invernadero, pero tampoco estimuló una mayor emergencia de las plantas, respecto al control. Se logró un mayor crecimiento de las raíces gracias a la inoculación con *P. putida* RC-93, que podría tener efectos benéficos en las plantas, por ejemplo ante condiciones hídricas y nutricionales escasas. Ambas cepas lograron una reducción de la intensidad de la viruela tardía (*N. personata*), para el caso de *P. putida* RC-93 mediante tres formas de aplicación diferentes: a la semilla, por riego y por aspersion, mientras que para *T. harzianum* ITEM 3636, se evaluó solamente por inoculación a la semilla, solo o en coinóculo con *P. putida* RC-93. La incorporación de estos microorganismos no generó aumentos en la producción de vainas y granos.

V. OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Determinar compuestos asociados a la inducción de defensa en maní por *Pseudomonas putida* RC- 93 y/o *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, frente a *Nothopassalora personata*

V. Determinar compuestos asociados a la inducción de defensa en maní por *Pseudomonas putida* RC- 93 y/o *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, frente a *Nothopassalora personata*

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Teniendo en cuenta la disminución de la enfermedad en invernadero tras la aplicación de los bioformulados, y a la lejanía entre estos y el patógeno, salvo la aplicación foliar de *P. putida* RC-93, es esperable que haya habido una inducción de las respuestas de defensa en la planta. Una forma de estudiar dicho efecto, es mediante la cuantificación de enzimas de defensa y proteínas relacionadas con la patogénesis, involucradas en la inducción del sistema inmune de la planta (Gupta *et al.*, 2013, 2020).

Partiendo del ensayo de invernadero 2018-2019, se procedió a la toma de muestras de folíolos para determinar la actividad enzimática. Los tratamientos evaluados fueron: **Ct**: control total, **C**: control con patógeno, **T**: semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, **Pr**: plantas regadas con la suspensión de *P. putida* RC-93 y **Pf**: plantas asperjadas con RC-93; salvo para el tratamiento Ct, todas las plantas fueron inoculadas con el patógeno *N. personata*. A los 130 DDS (estadio R5-R6) previo a las aplicaciones, se tomaron tres muestras de 10 folíolos cada una, entre las 15 repeticiones (macetas). Se lavaron las muestras en agua corriente, fueron colocadas en bolsitas de nylon y sumergidas en nitrógeno líquido por aproximadamente diez segundos, inmediatamente se retiró el exceso de nitrógeno y se las pasó a papel aluminio, para ser conservadas a -80°C hasta su procesamiento. Este representa el momento cero, ese mismo día, posterior a la toma de muestras, se procedió a la inoculación con *P. putida* RC-93, el patógeno o agua destilada estéril como se detalló previamente. Los siguientes muestreos se realizaron a los 3, 8 y 12 días desde el primero.

Para su procesamiento, se maceró rápidamente 1 gr de folíolos de cada muestra, en mortero preenfriado, con 1 ml de solución buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.8 más 1 mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y 1% PVP (polivinilpirrolidona) (Tonelli *et al.*, 2011). El líquido obtenido se transfirió a tubos Falcon, y se centrifugaron a 4°C y 12000 rpm por 3 min. El sobrenadante (que de ahora en más llamaremos extracto), fue dividido en alícuotas en tubos Eppendorf, que se conservaron a -20°C para la posterior

determinación de las actividades enzimáticas. Se cuantificó la actividad β -1,3-glucanasa, quitinasa (proteínas relacionadas con la patogénesis) y polifenoloxidasa (PPO) (enzima de defensa).

La técnica de determinación de actividad enzimática en un vegetal, consiste en primera medida, en realizar la mezcla de la enzima (o extracto vegetal en que se considera que está presente), con su sustrato específico, bajo condiciones adecuadas de temperatura y pH (propias de cada sistema enzima – sustrato) y posteriormente la cuantificación de uno o más productos liberados por la reacción.

1.1. Determinación de actividad β -1,3-glucanasa

Las β -1,3-glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en las plantas, teniendo múltiples efectos sobre su crecimiento y desarrollo; a su vez, poseen la capacidad de hidrolizar β -1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y están involucradas en la respuesta de defensa de las plantas, por lo que se las denomina proteínas relacionadas a la patogénesis (Balasubramanian *et al.*, 2012).

La cuantificación de β -1,3-glucanasas a partir de los extractos vegetales, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Anand *et al.* (2007), con algunas modificaciones. En tubos Falcon de 15 ml se colocaron 62,5 μ l del extracto junto con 62,5 μ l de laminarina 4% (p/v) suspendido en buffer acetato 50 mM pH 4.8. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 40°C. Los azúcares reductores liberados por la actividad enzimática se midieron según la metodología descrita por Miller (1959): a cada muestra se agregaron 375 μ l de DNS (ácido dinitrosalicílico), se incubaron durante 5 min a 100°C y luego durante 5 min en hielo para frenar la reacción. Posteriormente las muestras se diluyeron con 1 ml de agua destilada estéril (dilución 1/3), se agitaron en vortex rápidamente y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas. El proceso se realizó cuatro veces, una por cada tiempo (0, 3, 8 y 12 días post inoculación), contemplando las tres repeticiones de los cinco tratamientos (15 muestras por tiempo).

Para obtener la actividad enzimática en cada una de las muestras, es necesario correlacionar los valores obtenidos de absorbancia, con su respectiva concentración de glucosa. Primero se debe realizar una curva estándar de glucosa, para obtener la relación entre absorbancia y concentraciones de glucosa conocidas, para ello también se utilizó la

metodología descrita por Miller (1959), de cuantificación de azúcares reductores. Se utilizó agua destilada estéril, una solución estándar de glucosa 0,2 % (p/v) y DNS; en tubos Falcon de 15 ml se prepararon muestras con distinta concentración de glucosa (Tabla A1, anexos). Las muestras fueron incubadas 5 min a 100°C y posteriormente 5 min en hielo para frenar la reacción. Se midió la absorbancia a 540 nm con un lector de microplacas. El procedimiento se realizó por triplicado. Posteriormente, se calculó el promedio de los tres valores de absorbancia para cada muestra y se graficó la absorbancia versus concentración de glucosa, para obtener una curva y su función lineal (Tabla A2 y Figura A1, anexos). Dicha función fue la que posteriormente permitió calcular la concentración de glucosa en los extractos vegetales de los diferentes tratamientos según su absorbancia (pasos detallados en el punto X.3.2.1, anexos).

Una unidad de β -1,3-glucanasa (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por minuto de reacción; mientras que una unidad de actividad β -1,3-glucanasa, es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por ml de mezcla de reacción por minuto (U/ml).

1.2. Determinación de actividad quitinasa

Las quitinasas actúan sobre la quitina en la pared celular de los hongos, afectando los enlaces carbono entre monómeros de N-acetilglucosamina. Al igual que la β -1,3-glucanasa, son consideradas proteínas relacionadas con la patogénesis, que pueden a su vez, liberar productos que actúan como elicitores en las cascadas de señalización involucradas en las respuestas de defensa local y sistémica de las plantas (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Para su determinación, se siguió la metodología propuesta por El Komy *et al.* (2015): se colocaron 500 μ l de quitina 0,5% (quitina coloidal en buffer acetato 50 mM pH 5.2) en tubos Falcon, a los que se le adicionó 500 μ l de extracto vegetal y se incubaron a 37°C por 4 horas en agitación. Posteriormente, se agregaron 500 μ l de DNS e inmediatamente se colocaron en agua hirviendo 5 min y otros 5 min en hielo. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm en lector de microplacas. Para llevar los valores de absorbancia a actividad enzimática, se utilizó una curva de N-acetilglucosamina extraída de bibliografía

(Saraihon, 2016), de la cual se utilizó la función lineal del mismo modo que para la actividad β -1,3-glucanasa (Figura A2 y pasos detallados en punto X.3.3.1, anexos).

Una unidad de actividad quitinasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de N-acetilglucosamina por ml de mezcla de reacción por minuto (U/ml).

1.3. Determinación de actividad polifenoloxidasa

Las PPO participan en la oxidación de polifenoles a quinonas (compuestos con actividad antimicrobiana), en la lignificación de paredes vegetales, y pueden estar relacionadas con resistencia a enfermedades (Ardila e Higuera, 2005).

Para la cuantificación de esta enzima de defensa, se utilizó la metodología propuesta por Mayer *et al.* (1966). Se mezcló 1,95 ml de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6.5 a 25°C, con 50 μ l del extracto vegetal y 1 ml de catecol 100 mM. Inmediatamente, se realizó la medición de la absorbancia en espectrofotómetro a 410 nm cada 1 min durante 5 min, repitiendo el proceso para cada una de las muestras de manera individual. En este caso, U es la cantidad de enzima necesaria para generar un incremento de 0.001 en la absorbancia, por minuto de reacción, por lo que la actividad enzimática se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad (U/ml)} = \frac{[(\text{AF muestra} - \text{AI muestra}) - (\text{AF blanco} - \text{AI blanco})]}{(0.001 \times t)}$$

Siendo AF la absorbancia final, AI la absorbancia inicial y t el tiempo (5 min en este caso) (da Silva y Koblitz, 2010).

2. RESULTADOS

2.1. Actividad enzimática β -1,3-glucanasa

En todos los tratamientos se observó una ligera disminución de la actividad enzimática β -1,3-glucanasa a los 3 días post inoculación respecto al día 0; posteriormente las actividades aumentaron a los 8 días y continuaron subiendo hasta los 12 días en todos los casos (Tabla 12 y Figura 29). No se encontraron diferencias entre los tratamientos en ninguno de los momentos evaluados.

Tabla 12: Actividad enzimática β -1,3-glucanasa en folíolos de maní según tratamiento con los diferentes bioformulados e inoculación con *N. personata*, ensayo de invernadero 2018/19

Trat.	0 DDI	3 DDI	8 DDI	12 DDI
Ct	2,00 \pm 0,07 a	1,70 \pm 0,11 a	2,28 \pm 0,13 a	2,53 \pm 0,07 a
C	2,12 \pm 0,15 a	1,83 \pm 0,02 a	2,25 \pm 0,05 a	2,55 \pm 0,14 a
Pf	1,86 \pm 0,10 a	1,59 \pm 0,11 a	2,26 \pm 0,14 a	2,24 \pm 0,10 a
Pr	1,88 \pm 0,06 a	1,74 \pm 0,08 a	2,35 \pm 0,02 a	2,44 \pm 0,14 a
T	1,98 \pm 0,06 a	1,84 \pm 0,05 a	2,41 \pm 0,15 a	2,55 \pm 0,07 a

Valores expresados en U/ml \pm error estándar. DDI: días después de la inoculación. Ct: control total (sin inocular con el patógeno). C: control. Pf: *Pseudomonas putida* RC-93 foliar. Pr: *P. putida* RC-93 riego. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

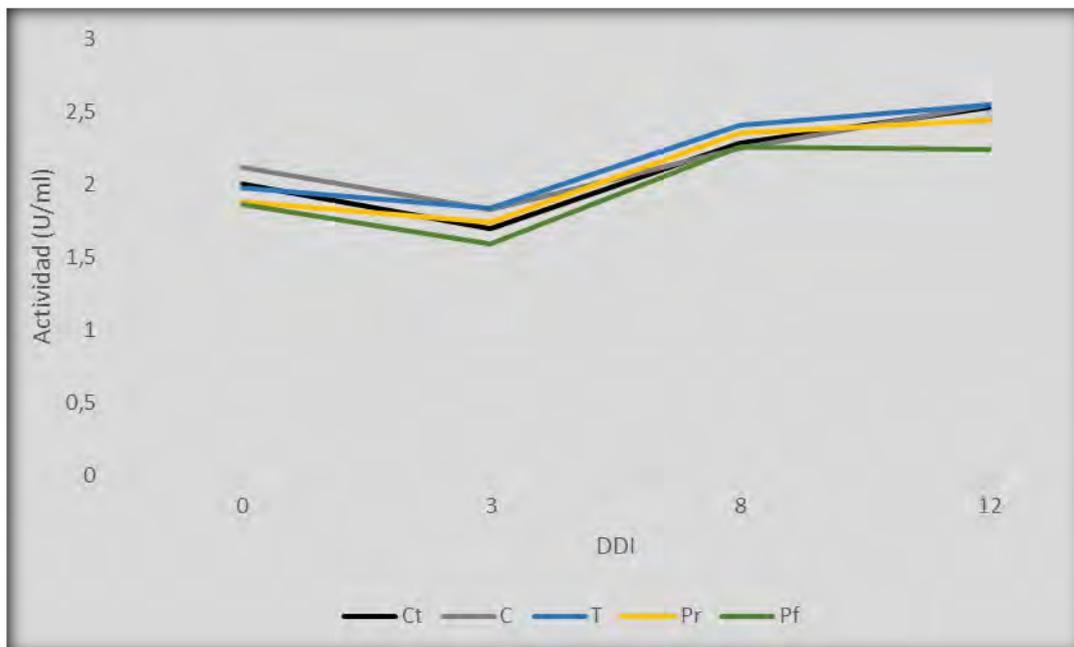


Figura 29: Actividad enzimática β -1,3-glucanasa en folíolos de maní según los tratamientos con bioformulados e inoculación con *N. personata*. Ct: control total (sin inocular con el patógeno). C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. Pr: *Pseudomonas putida* RC-93 riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. DDI: días después de la inoculación.

2.2. Actividad enzimática quitinasa

En el caso de esta enzima, se observó que la actividad fue disminuyendo en todos los tratamientos a medida que se avanzó en el momento de extracción hasta los 8 DDI, para luego aumentar en todos los casos, hacia los 12 DDI; siendo el tratamiento con *P. putida* RC-93 foliar, el que presentó los cambios más marcados (Tabla 13 y Figura 28). Al igual que para la anterior enzima cuantificada, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, a lo largo de los días de muestreo.

Tabla 13: Actividad enzimática quitinasa en folíolos de maní según tratamiento con los diferentes bioformulados e inoculación con *N. personata*, ensayo de invernadero 2018/19

Trat.	0 DDI	3 DDI	8 DDI	12 DDI
Ct	0,03 ± 0,0036 a	0,028 ± 0,0023 a	0,019 ± 0,0009 a	0,024 ± 0,01 a
C	0,039 ± 0,0019 a	0,025 ± 0,01 a	0,017 ± 0,0009 a	0,025 ± 0,01 a
Pf	0,032 ± 0,0033 a	0,027 ± 0,01 a	0,018 ± 0,0015 a	0,028 ± 0,01 a
Pr	0,042 ± 0,01 a	0,022 ± 0,01 a	0,015 ± 0,0012 a	0,018 ± 0,0007 a
T	0,037 ± 0,0009 a	0,026 ± 0,01 a	0,018 ± 0,0017 a	0,024 ± 0,0043 a

Valores expresados en U/ml ± error estándar. DDI: días después de la inoculación. Ct: control total (sin inocular con el patógeno). C: control. Pf: *Pseudomonas putida* RC-93 foliar. Pr: *P. putida* RC-93 riego. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

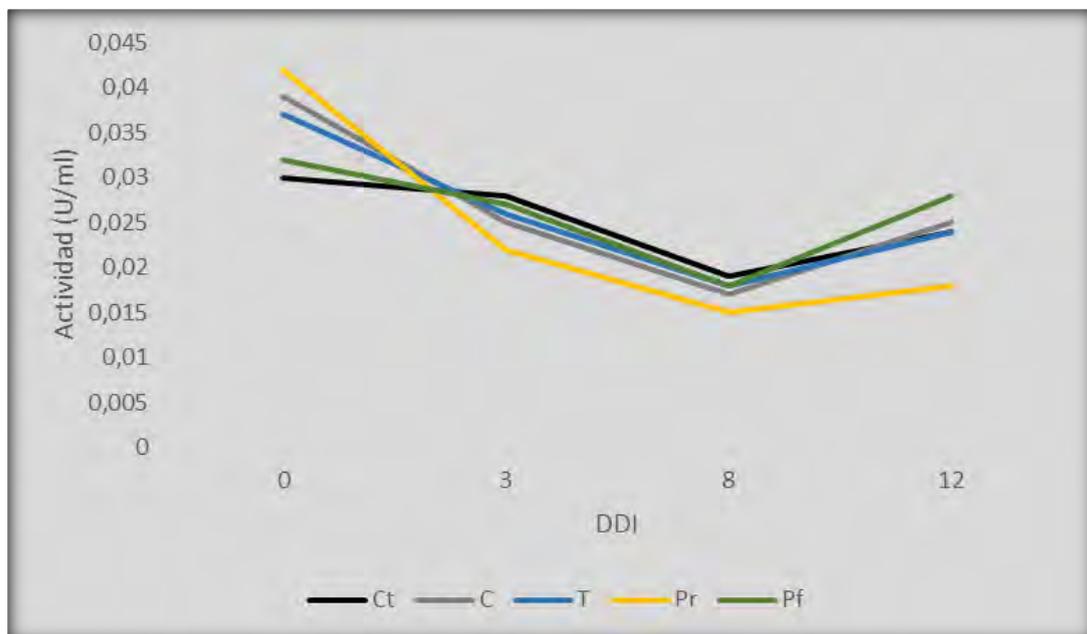


Figura 30: Actividad enzimática quitinasa en folíolos de maní según los tratamientos con bioformulados e inoculación con *N. personata*. Ct: control total (sin inocular con el patógeno). C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. Pr: *Pseudomonas putida* RC-93 riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. DDI: días después de la inoculación.

2.3. Actividad enzimática polifenoloxidasa

La actividad de la PPO tuvo un comportamiento muy diferente a las anteriores, se evidenció que la misma aumentó en todos los tratamientos a medida que se avanzó en el momento de la extracción del tejido vegetal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, sin embargo, se puede observar que la actividad PPO del control total (Ct) y del control (C) estuvo siempre por debajo del resto, a lo largo del tiempo (Tabla 14 y Figura 31).

Tabla 14: Cambios de actividad enzimática PPO en folíolos de maní según tratamiento con los diferentes bioformulados e inoculación con *N. personata*, ensayo de invernadero 2018/19

Trat.	0 DDI	3 DDI	8 DDI	12 DDI
Ct	17,07 ± 3,95 a	15,93 ± 5,95 a	22,73 ± 5,77 a	24,67 ± 4,07 a
C	15,87 ± 2,21 a	19,67 ± 6,18 a	20,80 ± 5,25 a	26,20 ± 4,74 a
Pf	18,67 ± 1,88 a	24,07 ± 6,27 a	24,27 ± 6,14 a	28,20 ± 3,56 a
Pr	21,40 ± 3,50 a	25,00 ± 7,22 a	23,80 ± 5,14 a	27,40 ± 4,30 a
T	18,67 ± 2,36 a	22,33 ± 6,45 a	24,53 ± 4,90 a	26,47 ± 3,45 a

Valores expresados en U/ml ± error estándar. DDI: días después de la inoculación. Ct: control total (sin inocular con el patógeno). C: control. Pf: *Pseudomonas putida* RC-93 foliar. Pr: *P. putida* RC-93 riego. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

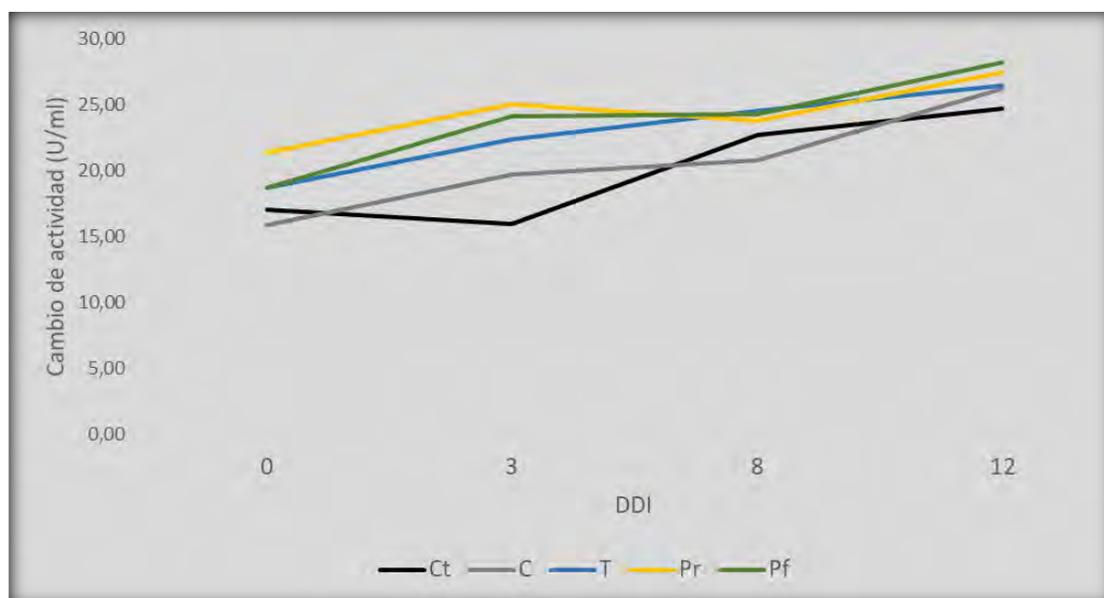


Figura 31: Actividad enzimática PPO en folíolos de maní según los tratamientos con bioformulados e inoculación con *N. personata*. Ct: control total (sin inocular con el patógeno). C: control. T: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 en semilla. Pr: *Pseudomonas putida* RC-93 riego. Pf: *P. putida* RC-93 foliar. DDI: días después de la inoculación.

3. DISCUSIÓN

La respuesta tipo ISR es efectiva frente a un amplio número de patógenos, y su efecto ha sido descrito para varias cepas de *Pseudomonas* en diferentes cultivos (Anand *et al.*, 2007; Bakker *et al.*, 2007; Pastor *et al.*, 2016). Del mismo modo, muchos trabajos describen esta habilidad en cepas del género *Trichoderma*, la cual estaría vinculada a diferentes compuestos, capaces de activar las rutas de defensa en las plantas, por ejemplo la generación de altos niveles de ácido jasmónico y salicílico (Barakat *et al.*, 2019). La producción de compuestos volátiles por parte de *Trichoderma* también sería fundamental en la inducción de resistencia en las plantas, lo que a su vez, parece estar fuertemente ligado a la producción de óxido nítrico en las raíces (Nawrocka *et al.*, 2019; Pescador *et al.*, 2022).

Puntualmente para el cultivo de maní, hay trabajos que indican este tipo de mecanismo de biocontrol en diferentes agentes, como *Methylobacterium* frente a *Aspergillus niger* y *Sclerotium rolfii* (Madhaiyan *et al.*, 2006), *Bacillus* y *Pseudomonas* frente a *S. rolfii* (Tonelli *et al.*, 2011; Figueredo *et al.*, 2017), *Serratia* y *Pseudomonas* frente a *Nothopassalora personata* (Kishore *et al.*, 2005b). Por otro lado, hay trabajos en que se sostiene que el maní, no sería una especie que responda a este mecanismo (Zhang *et al.*, 2001). Sin embargo, los compuestos que se miden y las técnicas empleadas difieren en cada caso. El incremento en la actividad de las proteínas relacionadas con la patogénesis y su acumulación, dependen del agente, de la planta, condiciones fisiológicas y del patógeno (Madhaiyan *et al.*, 2006).

En el presente trabajo, para el caso de β -1,3-glucanasa y quitinasa, se observó una disminución en la actividad enzimática en un principio, pero luego hubo un aumento de las mismas hacia el final de las evaluaciones. Por su parte, la PPO mostró un constante aumento de su actividad a lo largo de los tiempos de muestreo. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, lo cual puede ser debido a múltiples causas; si bien las cepas estudiadas generaron una disminución de la intensidad de la enfermedad en invernadero, el nivel de actividad enzimática puede que no haya sido suficiente para detectar diferencias, o que los compuestos involucrados sean otros.

Para el caso de la quitinasa, con la técnica empleada lo que se miden son exoquitinasas, sin embargo Boller y Mauch (1988) sostienen que en las plantas, lo que habría en mayor cantidad son endoquitinasas, cuyo principal producto de reacción son quitoooligosacáridos, lo que requiere un paso extra en el que se utiliza una citohelicasa extraída principalmente de intestino de caracol, para obtener monómeros de N-acetilglucosamina, que sumados a los obtenidos a partir de la acción de las exoquitinasas, dan una idea del total de actividad enzimática de las quitinasas en la planta.

Shukla y Suthar (2018) en un trabajo sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* raza 4 en variedades de garbanzo, reportaron que la actividad glucanasa fue aumentando a medida que crecía la presión del patógeno, mientras que la actividad quitinasa solo fue inducida con valores elevados de presión. A su vez, los resultados que encuentran muestran que en ninguno de los casos hubo una tendencia clara de la actividad de estas enzimas, con ascensos y descensos, similar a lo ocurrido en nuestro caso.

Hay trabajos en los que también miden compuestos como peroxidasa (PO), fenilalanina amonioliasa (PAL), catalasas, fenoles totales, entre otros. En algunos casos encuentran claros aumentos en la actividad enzimática con la aplicación de bioformulados a base de ACB, en otros no, o sólo para algunos de los compuestos evaluados, y también es destacable que los momentos en que toman muestras difieren mucho entre los trabajos. Anand *et al.* (2007) inocularon plantas de tomate de 60 días con *P. fluorescens* y al otro día con diferentes patógenos, encontrando que la actividad PO, PPO, PAL, β -1,3-glucanasa, quitinasa, catalasa y fenoles aumentaban. Tomaron hojas a los 0,1,2,3,4,5 DDI, puntualmente para PPO, quitinasa y glucanasa, reportaron que su actividad aumentó hasta el día 3 y luego se mantenía constante para las plantas inoculadas con el ACB, mientras que el control sin inocular se mantuvo siempre igual, con valores más bajos. Dilley *et al.* (2016) aplicaron diferentes cepas de *Trichoderma* en semillas de poroto, a los 30 días de germinación evaluaron actividad enzimática en hojas y raíces, observando que la actividad PO, PPO y PAL no tuvo diferencia entre las semillas tratadas y las control, pero la actividad β -1,3-glucanasa en hoja, se vio disminuida por 13 de las 21 cepas evaluadas, en este caso no hubo una confrontación con ningún patógeno.

Para el caso del maní, Madhaiyan *et al.* (2006) inocularon semillas con *Methylobacterium* sp., y a los 30 DDS aplicaron de manera foliar *Aspergillus niger* y *Sclerotium rolfsii*. Luego midieron actividad enzimática desde las 0 a 96 horas post inoculación y encontraron que las actividades PO, PAL, y β -1,3-glucanasa aumentaron constantemente hasta las 72

horas y luego bajaron notablemente. En nuestro caso, la actividad β -1,3-glucanasa a las 72 hs había disminuido respecto al momento 0, y posteriormente aumentó hasta los 12 DDI (último momento de muestreo). En otro trabajo, Tonelli *et al.* (2011) reportaron que las cepas *Bacillus* sp. CHEP5 y *Pseudomonas* sp. BREN6 redujeron la severidad del marchitamiento en maní por *S. rolfsii*, tras inocular con el patógeno y los ACB por separado, en raíces a los 15 días de emergencia. A los 13 días de la inoculación, cuantificaron la actividad de algunas enzimas. La actividad PO solo aumentó con la cepa BREN6, mientras que la actividad PAL aumentó con ambas cepas, pero al inocular con el patógeno solo aumentó con CHEP5. También cuantificaron β -1,3-glucanasa, cuya actividad aumentó con ambas cepas, pero al aplicar el patógeno, la actividad con la cepa CHEP5 fue menor que sin inocular CHEP5, pero con BREN6 se llegaron a los valores más altos. Esto también demuestra lo variables que pueden ser los resultados dependiendo de cada patógeno y ACB. En otro ensayo, sin el uso de patógenos, Gupta *et al.* (2020) sembraron plántulas de maní recién germinadas en macetas que inocularon con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* P4, y a los 10 y 30 días encontraron un incremento en la actividad de las enzimas catalasa, PPO y PAL en las raíces y tallos, lo que también demuestra la importancia del órgano seleccionado para las determinaciones, en nuestro caso fueron las hojas, debido a que es el órgano donde se realizaron las inoculaciones con el patógeno, y donde este básicamente infecta.

Específicamente para el caso de viruela del maní, Kishore *et al.* (2005b) reportaron que la aplicación de las cepas *Serratia marcescens* GPS5 y *Pseudomonas aeruginosa* GSE18 en hojas de maní de 30 días, 24 horas previas a la aplicación de *N. personata*, generó un aumento de las enzimas quitinasa, β -1,3-glucanasa, PO y PAL. La actividad quitinasa subió hasta los 7 DDI, principalmente con GPS5, y luego bajó muy lento, mientras que en el presente trabajo, la actividad quitinasa fue en constante disminución hasta los 8 DDI y subió marcadamente a los 12 DDI. Por su parte, para la β -1,3-glucanasa reportaron que su actividad bajó de manera constante en el control, pero en el resto de los tratamientos, subió levemente hasta los 4/5 DDI y luego bajó, siendo que en el presente trabajo, la actividad bajó levemente a los 3 DDI, pero luego se mantuvo en ascenso en todos los tratamientos evaluados, incluso el control.

La diversidad de resultados encontrados en los diferentes trabajos, demuestra la variabilidad que existe entre los diferentes sistemas ACB – huésped – patógeno, como así también la importancia del momento de evaluación, el órgano utilizado, el compuesto que

se cuantifica y la metodología escogida para hacerlo; sin embargo, es un área muy interesante para seguir explorando, que puede brindar resultados que permitan conocer con mayor profundidad lo que sucede en este tipo de interacciones.

La inoculación con las cepas *T. harzianum* ITEM 3636 y *P. putida* RC-93 en maní, no generó un cambio en la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa, quitinasa y PPO, aún en las que fueron infectadas con el patógeno *N. personata*. Si bien las plantas inoculadas con dichas cepas, tuvieron una menor intensidad de la enfermedad, lo encontrado en el presente objetivo indicaría que posiblemente las enzimas evaluadas no fueron las responsables. De todos modos sería interesante continuar evaluando las mismas en otros ensayos, modificando los momentos de muestreo, probando con otra metodología, y estudiar el comportamiento de otros compuestos que pueden estar involucrados en una ISR.

VI. OBJETIVO ESPECÍFICO 3

Observar la interacción y colonización de raíces de maní por *Trichoderma harzianum* ITEM 3636

VI. Observar la interacción y colonización de raíces de maní por *Trichoderma harzianum* ITEM 3636

Los ACB deben ser capaces de colonizar rápidamente los sitios “target” y adaptarse a las condiciones que se presenten una vez introducidos (Ruano Rosa *et al.*, 2016). Ante determinadas condiciones, algunas cepas pueden penetrar en el interior de las plantas y comportarse como endófitas, lo que les brindaría una mayor protección. Esto se ha reportado para muchas cepas de *Trichoderma* (Martinez Medina *et al.*, 2016; Carro-Huerga *et al.*, 2020; Tseng *et al.*, 2020), capaces de comportarse como endófitas y proveer a las plantas, numerosos efectos benéficos (Harman y Uphoff, 2019; Ikram *et al.*, 2019).

Con el objetivo de estudiar si la cepa *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 es capaz de ingresar en las raíces de maní y comportarse como un hongo endófito, se llevó a cabo el presente experimento.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, se procedió a la desinfección de las semillas, para lo cual se colocaron 30 segundos en alcohol 70 %, luego 3 minutos en hipoclorito de sodio 2 % y posteriormente se hicieron cinco lavados en agua destilada estéril. Se dejaron secar sobre papel estéril dentro de flujo laminar y luego se colocaron dentro de bolsitas de nylon, donde se agregó carboximetilcelulosa (CMC) al 2%, se realizó un suave mezclado de las semillas cada 10 minutos aproximadamente hasta que estuvieron secas y luego se adicionó agua destilada estéril para el control (C) o la suspensión de *T. harzianum* 5×10^6 (T), 10 ml cada 100 gr de semillas y se volvió a realizar el mezclado hasta estar secas. En un recipiente desinfectado, con arena estéril humedecida, se sembraron 30 semillas de C y en otro igual, 30 semillas de T a 3 cm de profundidad (Figura 32). Los recipientes se cubrieron con sus tapas y fueron colocados en cámara de crecimiento a 25 °C y 80 % de humedad relativa, en oscuridad por cuatro días y posteriormente con ciclos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad.

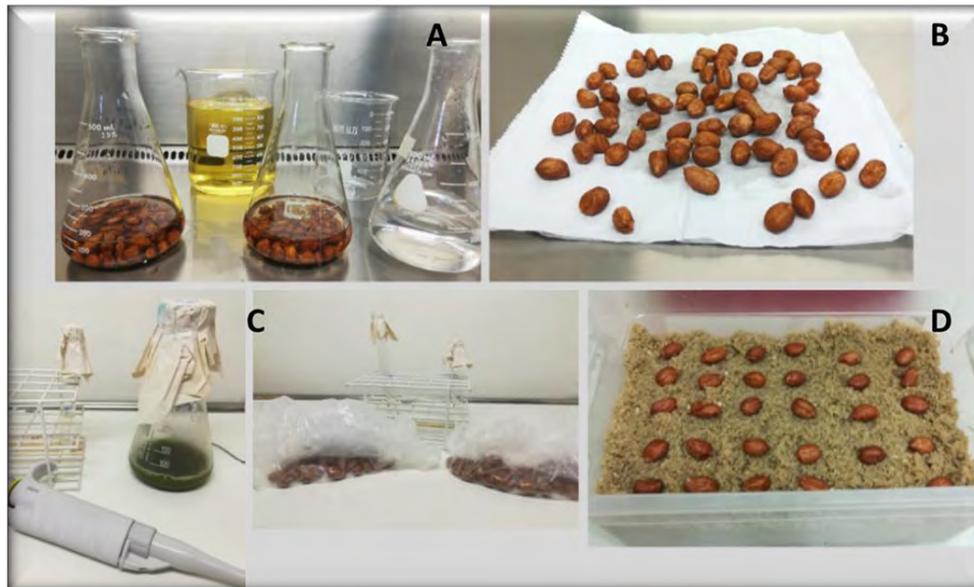


Figura 32: Acondicionamiento de semillas de maní. A: desinfección. B: secado. C: inoculación D: siembra.

A los siete días posteriores a la siembra, se tomaron plántulas al azar de cada uno de los tratamientos y fueron lavadas vigorosamente con agua destilada (Figura 33 A y B). Posteriormente se separó la raíz de la parte aérea (Figura 33 C) y se efectuaron cortes transversales y longitudinales con bisturí.

Para el procesamiento de las muestras, se siguió una metodología basada en Nogueira-Lopez *et al.* (2018) y Redkar *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Todos los cortes de raíces fueron colocados en tubos Eppendorf de 2 ml con etanol 100 % por tres días para eliminar cualquier resto de clorofila que pudiera haber en los tejidos (Figura 33 D). Posteriormente, se cambió el etanol por KOH al 10% y se colocaron los tubos por 4 horas a 85°C en termobloque (Figura 33 E), para ablandar el tejido y tornarlo más transparente (Figura 33 F). Al cumplir ese tiempo, se dejaron enfriar las muestras y se colocó buffer fosfato salino (phosphate buffered saline - PBS) por 5 minutos, luego se removió para eliminar restos de KOH y se volvió a agregar PBS por una hora para neutralizar el pH. Luego el PBS se reemplazó por la solución de tinción compuesta por aglutinina de germen de trigo Alexa Fluor 488 (WGA - Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y yoduro de propidio (PI - Sigma-Aldrich, USA) (20 µg/ml PI; 10 µg/ml WGA-Alexa Fluor TM 488, 0.1% Tween 20 en PBS 1X, preparación detallada en punto X.4, anexos) (Figura 34 A); la cual se dejó por 2 horas y luego se cambió por PBS, que fue removido para eliminar el exceso de colorantes (Figura 34 B) y se volvió a agregar PBS para preservar las muestras en frío (4°C) y oscuridad hasta su observación al microscopio (Figura 34 D).

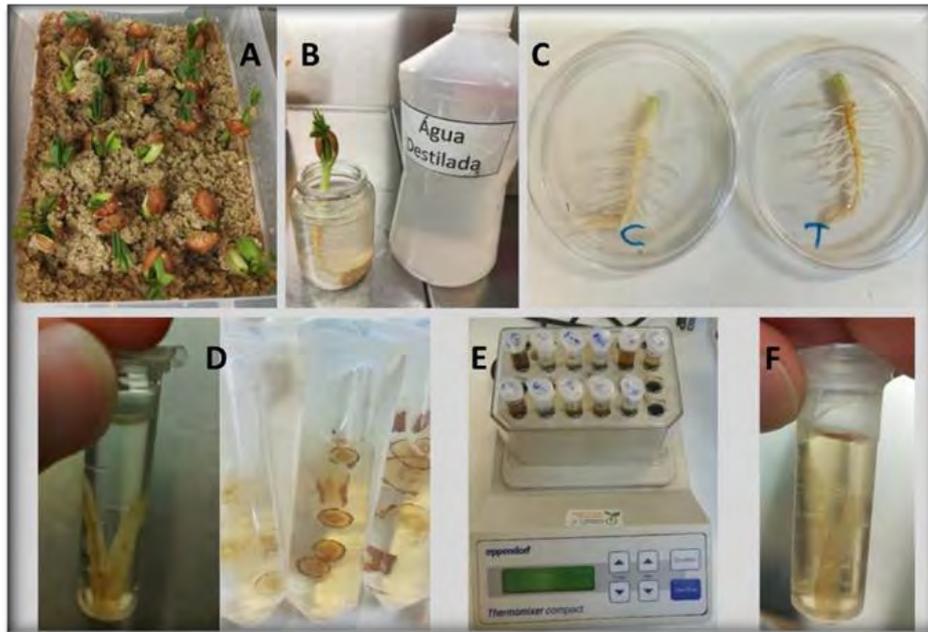


Figura 33: Procesamiento de muestras y fijación de tejido para su posterior tinción. A: plántulas de maní 7 días posteriores a la siembra. B: lavado de plántulas con agua destilada. C: raíces de maní con ambos tratamientos, con *T. harzianum* ITEM 3636 (T) y sin (C). D: fijación de los cortes en etanol 100%. E: incubación de muestras en termobloque. F: colocación de cortes en buffer PBS.

Para su observación en microscopio confocal, se colocó sobre un portaobjetos una gota de PBS mas glicerol en partes iguales, y encima el tejido a observar y cubreobjetos (Figura 34 C). Se utilizó un microscopio Carl Zeiss LSM700 y el software ZEN 2011 (black edition), con los objetivos EC Plan-Neofluar 10x/0.30 y Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC. Las muestras fueron excitadas usando láseres de 488 y 555 nm (2% de intensidad), se captaron las señales verde y roja fluorescentes al igual que la luz transmitida del láser 488 nm. Se tomaron imágenes simples y pilas de imágenes consecutivas (Z-stacks, cortes cada 1 μm), para poder presentarlas a su vez, como imágenes 3D y vistas ortogonales.

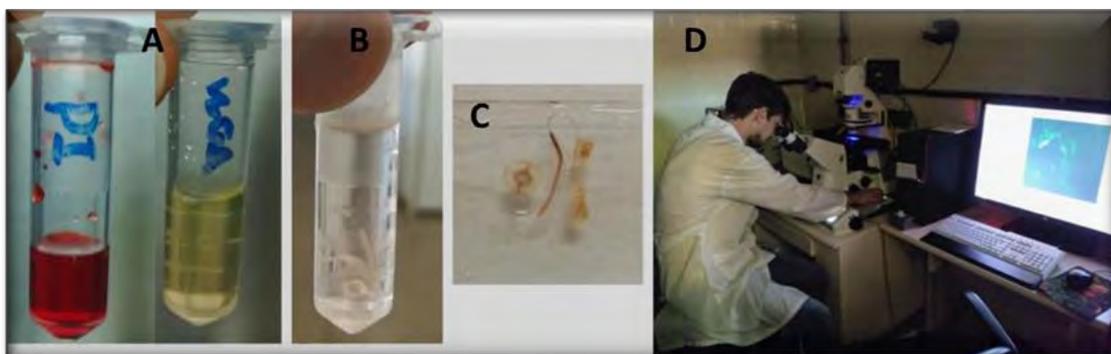


Figura 34: Tinción de muestras y observación en microscopio confocal. A: soluciones de yoduro de propidio (PI) y aglutinina de germen de trigo (WGA). B: colocación de muestras en solución de tinción. C: disposición de muestras para su observación. D: observación en microscopio confocal.

2. RESULTADOS

Para determinar si la cepa *T. harzianum* ITEM 3636 se comporta como endófito de las raíces de maní, se realizó la tinción de tejidos utilizando reactivos que permitieron su visualización en microscopio confocal de barrido láser. La WGA se une a la quitina de la pared celular del hongo y al estar marcado con el fluoróforo verde fluorescente Alexa Fluor TM 488, permite que sea observado bajo microscopía confocal (Mochizuki *et al.*, 2011). Por otro lado, el PI se adhiere a las paredes celulares de las plantas, y bajo su observación en microscopio confocal, genera un contraste de color rojo fluorescente con el anterior (Nogueira-Lopez *et al.*, 2018).

Al observar una serie de cortes longitudinales y transversales de raíces cuyas semillas habían sido inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636 (T), se pudo identificar al hongo por la reflexión del color verde de sus hifas en contraste con el color rojo reflejado por las paredes celulares de las raíces (Figuras 36 a 41), dicho contraste no fue observado en los controles sin inocular (C), donde solo se vio la reflexión del color rojo (Figura 35).

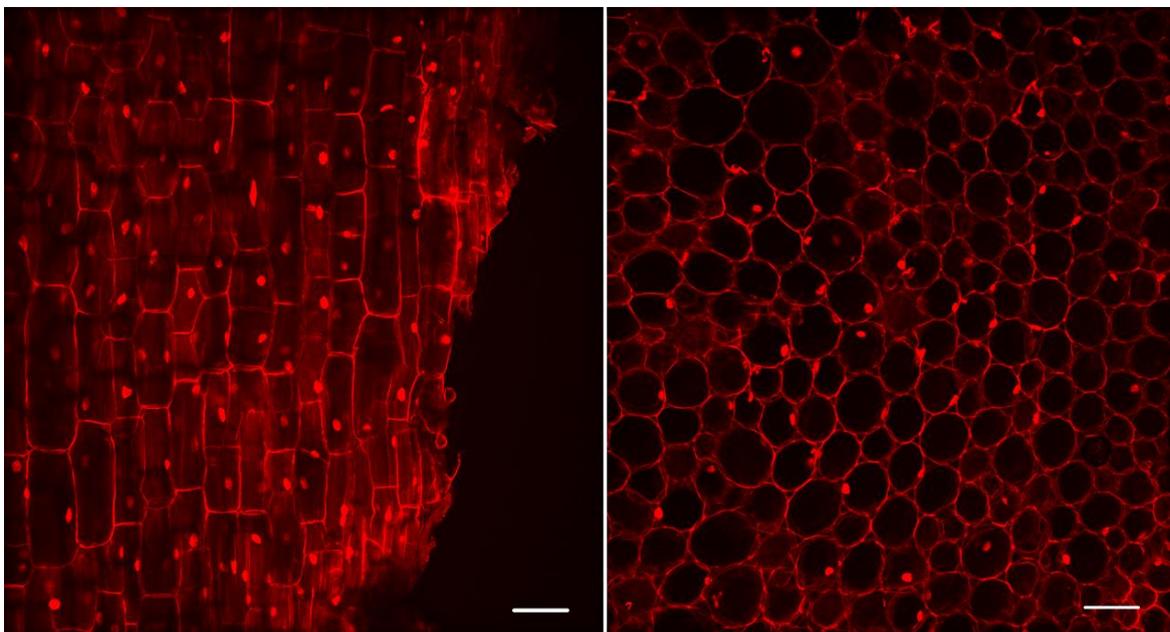


Figura 35: Corte longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) de raíces de maní, a partir de semillas sin inocular (C). Imagen 10X. La escala gráfica representa 100 μm .

En los cortes longitudinales de raíces del tratamiento con *T. harzianum* ITEM 3636, se pudo observar una densa red de hifas color verde, sobre la superficie de las células vegetales, en color rojo, mostrando una clara colonización de esos tejidos (Figura 36).

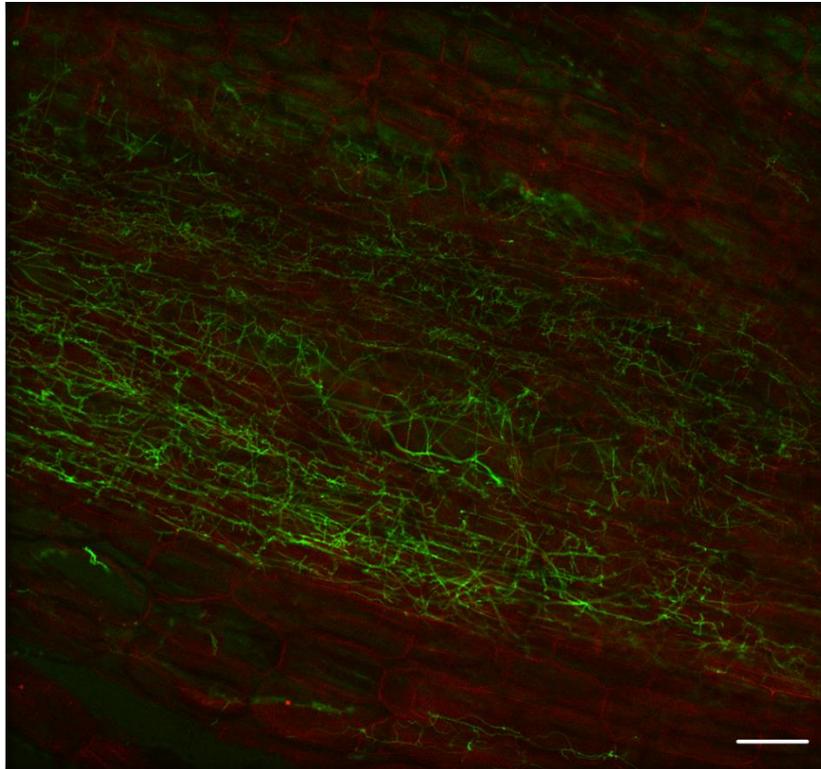


Figura 36: Corte longitudinal de raíz de maní, a partir de semillas tratadas con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. Imagen 10X. La escala gráfica representa 100 μm .

Debido al barrido en profundidad que permite el microscopio empleado, se pudieron observar hifas de *T. harzianum* ITEM 3636 dentro de los tejidos de las raíces, en espacios intercelulares e incluso intracelulares. Esto confirma la capacidad de esta cepa, de ingresar en las raíces de maní y colonizar endofíticamente sus capas más superficiales, como se muestra en las siguientes imágenes (Figuras 37 y 38).

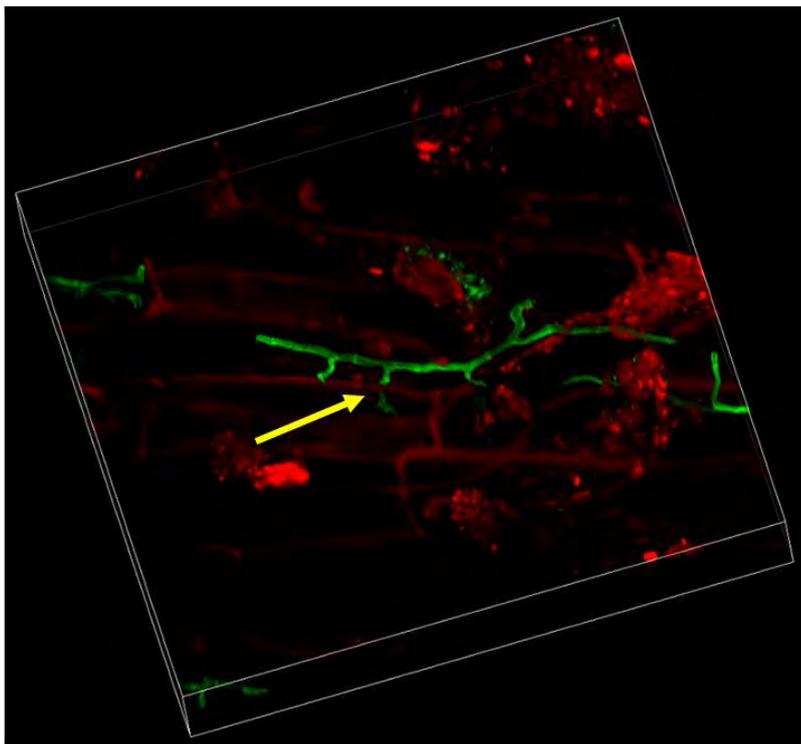


Figura 37: Vista en 3D construida desde corte longitudinal de raíz, a partir de semillas tratadas con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, mostrando colonización de las células de la corteza. La flecha señala la formación de un cuello en el sitio donde la hifa atraviesa la pared celular. Imagen 63X.

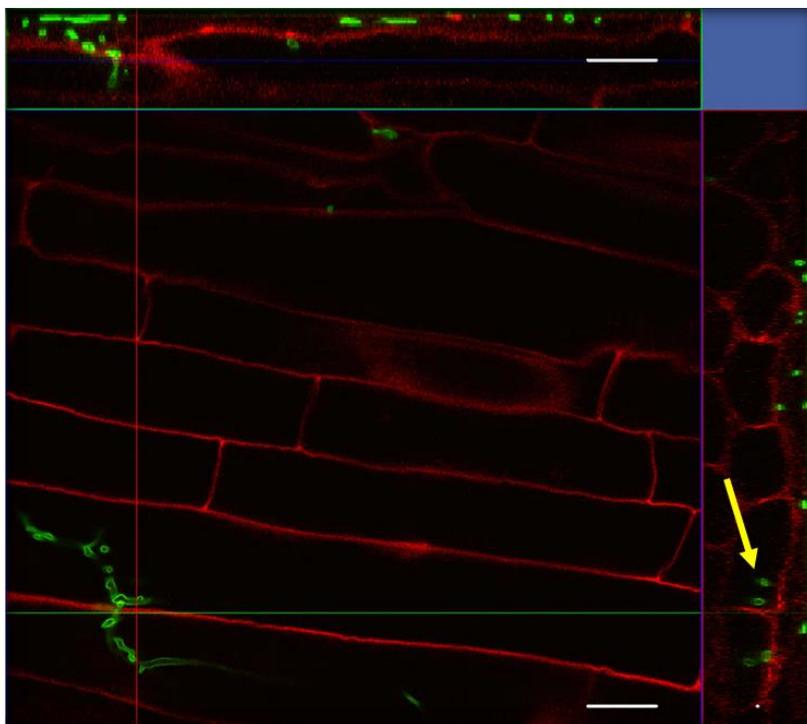


Figura 38: Imagen ortogonal de un corte longitudinal de raíz de mani, a partir de semillas tratadas con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636. La flecha indica hifas dentro de células vegetales. Imagen 63X. La escala gráfica representa 20 μm .

Algunas imágenes también permitieron evidenciar la formación de estructuras propias del hongo, como células “hinchadas” y “apresorios”, que le permiten adherirse a las células del vegetal y penetrar en su interior, respectivamente (Figuras 39 a 41).

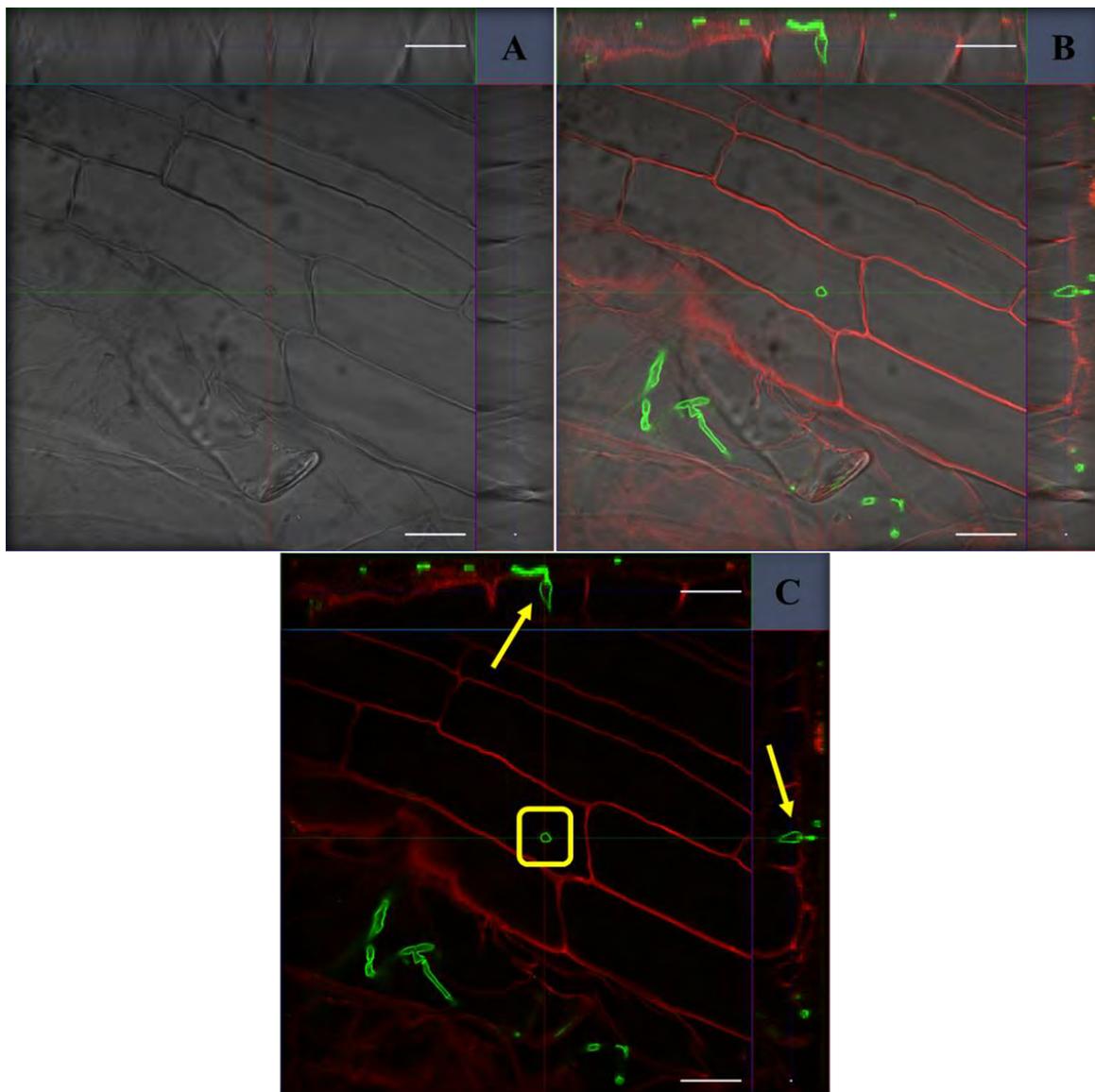


Figura 39: Imágenes ortogonales de corte longitudinal de tejido radical de maní, a partir de semillas tratadas con *T. harzianum* ITEM 3636. A: luz transmitida. B: luz transmitida más fluorescencia verde y roja. C: señales verde y rojo fluorescentes. El recuadro indica estructura tipo apresorio visto desde arriba, las flechas señalan la misma estructura ingresando en una célula. Imágenes 63X. Las escalas gráficas representan 20 μm .

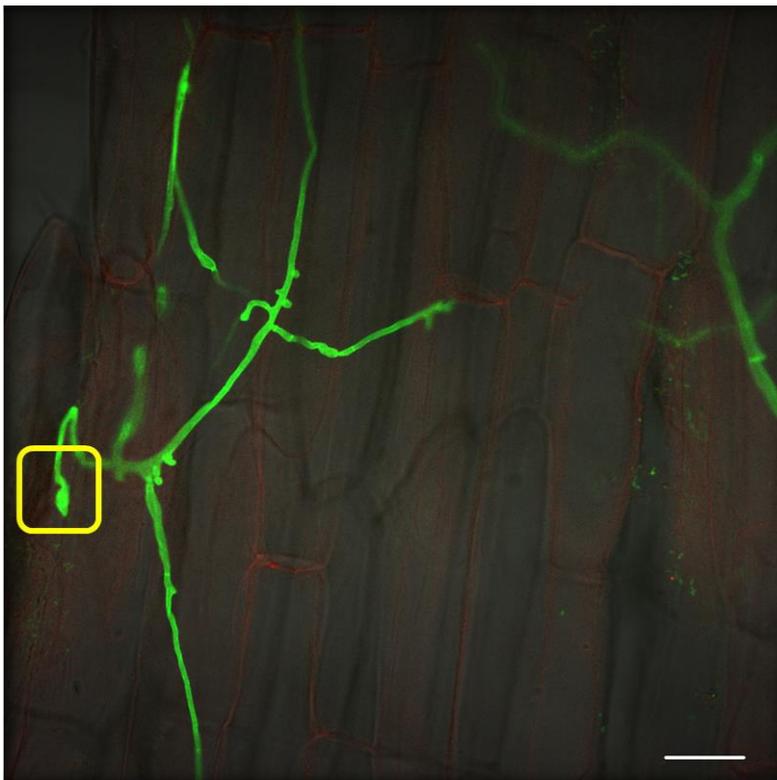


Figura 40: Corte longitudinal de raíz de maní, a partir de semillas tratadas con *T. harzianum* ITEM 3636 con luz transmitida más fluorescencia verde y roja. El recuadro indica formación de estructura tipo apresorio. Imagen 63X. La escala gráfica representa 20 μm .

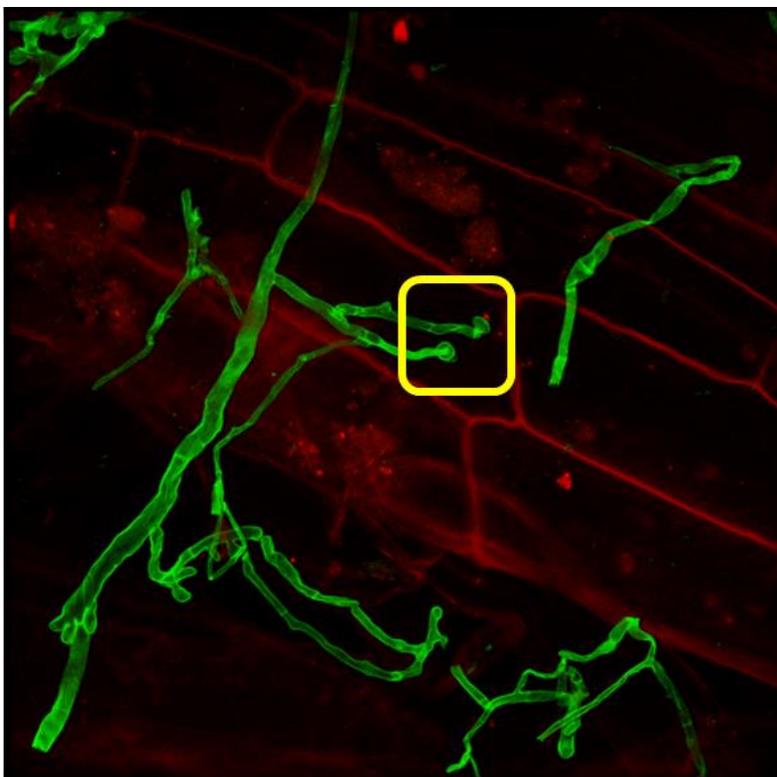


Figura 41: Imagen construida a partir de corte longitudinal de raíz de maní, semilla tratada con *T. harzianum* ITEM 3636, con señales verde y rojo fluorescentes. El recuadro indica formación de células “hinchadas” adheridas a la pared celular.

3. DISCUSIÓN

Si bien la rizósfera es uno de los lugares más comunes para *Trichoderma*, muchas especies han evolucionado hacia nuevos nichos ecológicos, siendo capaces de crecer dentro de raíces de plantas como endófitos facultativos (Druzhinina *et al.*, 2011), persistir por el ciclo de vida de la planta, y estimular ISR, generando una activación de las defensas más rápida y robusta luego del ataque de un patógeno (Martinez Medina *et al.*, 2016).

Se pudo determinar que la cepa *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 tiene la capacidad de comportarse como endófito de las raíces de maní, una vez que es aplicada en las semillas. La técnica de inoculación permitió, como se vio en la sección de metodología general, mediante microscopía electrónica de barrido, que los conidios queden adheridos al tegumento de las semillas tratadas, a partir de allí, estos germinan y pueden ingresar en las raíces de las plántulas, para colonizar los tejidos más externos de su corteza y epidermis. Esto coincide con lo informado en numerosos trabajos, para otras cepas del género *Trichoderma* en numerosas especies vegetales (Hohmann *et al.*, 2012; Woo *et al.*, 2014; Carrero-Carrón *et al.*, 2016; Dildey *et al.*, 2016; Harman y Uphoff, 2019; Ikram *et al.*, 2019), en la mayoría de los casos ejerciendo control sobre hongos fitopatógenos de manera directa o indirecta, induciendo resistencia local o sistémica (Harman *et al.*, 2004). Incluso, para algunas de estas cepas, el proceso de colonización de raíces es fundamental para lograr una protección efectiva de las plantas frente a fitopatógenos y para una estimulación del crecimiento vegetal (Hermosa *et al.*, 2012).

El desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas, entre ellas la microscopía confocal y técnicas de marcación, como la introducción de genes que expresen la proteína verde fluorescente (GFP), o la tinción con el uso de fluoróforos como en el presente trabajo, han permitido una descripción más clara de la colonización de raíces por parte de *Trichoderma*. Durante la colonización, sus hifas se enrollan alrededor de las raíces y forman estructuras tipo apresorio sobre su superficie, penetrando y posteriormente creciendo de manera intercelular en la epidermis y corteza; incluso el crecimiento puede ser intracelular, sin afectar la viabilidad de las células (Chacón *et al.*, 2007; Nogueira-Lopez *et al.*, 2018). Carro-Huerga *et al.* (2020) también utilizaron microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal de barrido laser, para estudiar una cepa de *Trichoderma* en vid, encontrando que la misma pudo colonizar plantas hasta 12 semanas después de su inoculación en heridas realizadas sobre el tallo, localizándose en xilema, fibras y tejido parenquimatoso dentro de la madera.

Trichoderma en las etapas iniciales de la interacción, expresa moléculas que pueden ser enzimas, péptidos, oligosacáridos y otros compuestos de bajo peso molecular que activan la inmunidad basal de la planta (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2013). Sin embargo, similar a lo que ocurre en las simbiosis micorríticas y en las interacciones rizobio-leguminosa (fijación biológica de nitrógeno), *Trichoderma* minimiza la estimulación del sistema inmune de la planta para poder colonizar sus raíces; pocas horas posteriores a la inoculación, ocurre una reprogramación generalizada de transcripción de genes en la planta, que lleva a una represión transitoria de su respuesta inmune, lo que permitiría la colonización (Brotman *et al.*, 2013).

La cepa *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 colonizó superficialmente las raíces de maní luego de su inoculación en las semillas. A su vez, se pudo observar que el hongo pudo penetrar y colonizar internamente las células corticales y de la epidermis de las raíces, comportándose como endófito. Esto le brindaría al hongo una mayor protección y permitiría una relación mas estrecha con el vegetal.

VII. OBJETIVO ESPECÍFICO 4

Evaluar el efecto combinado de fungicidas químicos y los bioformulados en el control de la viruela tardía del maní (*Nothopassalora personata*) y rendimiento del cultivo en ensayos de campo

VII. Evaluar el efecto combinado de fungicidas químicos y los bioformulados en el control de la viruela tardía del maní (*Nothopassalora personata*) y rendimiento del cultivo en ensayos de campo

Con el objetivo de evaluar el efecto de los bioformulados aplicados a la semilla, junto con la pulverización de fungicidas de síntesis química al follaje, sobre la intensidad de la viruela tardía y el rendimiento del cultivo, se ejecutaron ensayos a campo en diferentes años y localidades, para abarcar distintas condiciones agroecológicas.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Diseño de los ensayos y tratamientos

Los ensayos se realizaron en tres campañas agrícolas consecutivas: 2017/18, 2018/19 y 2019/20. En todos los años, se llevaron a cabo en dos lotes agrícolas en distintas localidades de la provincia de Córdoba, uno en General Cabrera (GC) y el otro, en cercanías de Vicuña Mackenna (VM) (especificaciones en Tabla 15). La primera de las localidades pertenece al departamento Juárez Celman, con al menos cinco décadas de historial en la producción de maní, mientras que la segunda se ubica al sur del departamento Río Cuarto, dentro de una zona considerada de más reciente introducción de este cultivo (March y Marinelli, 2005; Giayetto, 2017).

Tabla 15: Especificaciones de los lugares y condiciones donde se ejecutaron los ensayos a campo

Ensayo	Coordenadas	FS	FC	Pp.	Cv. previo
GC 2017/18	32°49'39.49''S 63°51'55.57''O	31/10	22/3	263	Soja
GC 2018/19	32°49'46.80''S 63°51'57.73''O	06/11	12/4	616	Soja
GC 2019/20	32°49'42.13''S 63°51'56.42''O	21/11	13/4	468	Maíz
VM 2017/18	33°56'14.39''S 64°27'51.95''O	24/10	03/4	298	Soja
VM 2018/19	33°56'33.07''S 64°28'20.68''O	08/11	05/4	563	Soja
VM 2019/20	33°46'11.41''S 64°25'12.34''O	19/11	04/4	398	Maíz

GC: General Cabrera. VM: Vicuña Mackenna. FS: fecha de siembra. FC: fecha de cosecha. Pp.: precipitaciones acumuladas en el ciclo (mm). Cv. previo: cultivo previo.

En todos los casos, el diseño experimental empleado fue en franjas (Figura 43), con tres repeticiones, donde cada una correspondía a una parcela de cuatro surcos distanciados a

0,70 m por 5 m de largo (14 m²). Los tratamientos probados fueron un total de 40, que surgen de la interacción de dos factores: inoculación de semillas con los bioformulados y fungicidas químicos aplicados en el follaje.

El primer factor fue la inoculación de las semillas con las suspensiones obtenidas como se especificó en la metodología general (Figura 42), y comprendía cuatro niveles: **T**: *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, **P**: *Pseudomonas putida* RC-93, **TP**: el coinóculo de las dos anteriores (en los tres casos las suspensiones tenían una concentración de 5x10⁶ conidios/UFC por mililitro) y **C**: control. Mientras que el segundo factor, aplicación de fungicidas al follaje, comprendía 10 niveles (Tabla 16).



Figura 42: Suspensiones para inoculación de semillas. De izquierda a derecha: agua destilada estéril (C), suspensión de *P. putida* RC-93 (P), *P. putida* RC-93 + *T. harzianum* ITEM 3636 (TP), *T. harzianum* ITEM 3636 (T).

Tabla 16: Principios activos de los fungicidas, dosis utilizadas y número de aplicaciones

Niveles	Principio activo	Dosis (cm ³ /ha)	Nº aplicaciones
1	Testigo	-	-
2	Pyraclostrobin (13,3%) + epoxiconazole (5%)	750	4
3	Fluxapyroxad (5%) + epoxiconazole (5%) + pyraclostrobin (8,1%)	1200	4
4	Clorotalonil (72%)	1400	5
5	Pyraclostrobin (13,3%) + epoxiconazole (5%)	750	2
6	Fluxapyroxad (5%) + epoxiconazole (5%) + pyraclostrobin (8,1%)	1200	2
7	Clorotalonil (72%)	1400	3
8	Pyraclostrobin (13,3%) + epoxiconazole (5%)	450	4
9	Fluxapyroxad (5%) + epoxiconazole (5%) + pyraclostrobin (8,1%)	720	4
10	Clorotalonil (72%)	840	5

Las pulverizaciones fueron realizadas con una mochila de gas carbónico con seis picos a 35 cm de distancia, utilizando pastillas tipo cono hueco y con un volumen de 180-200 l/ha.

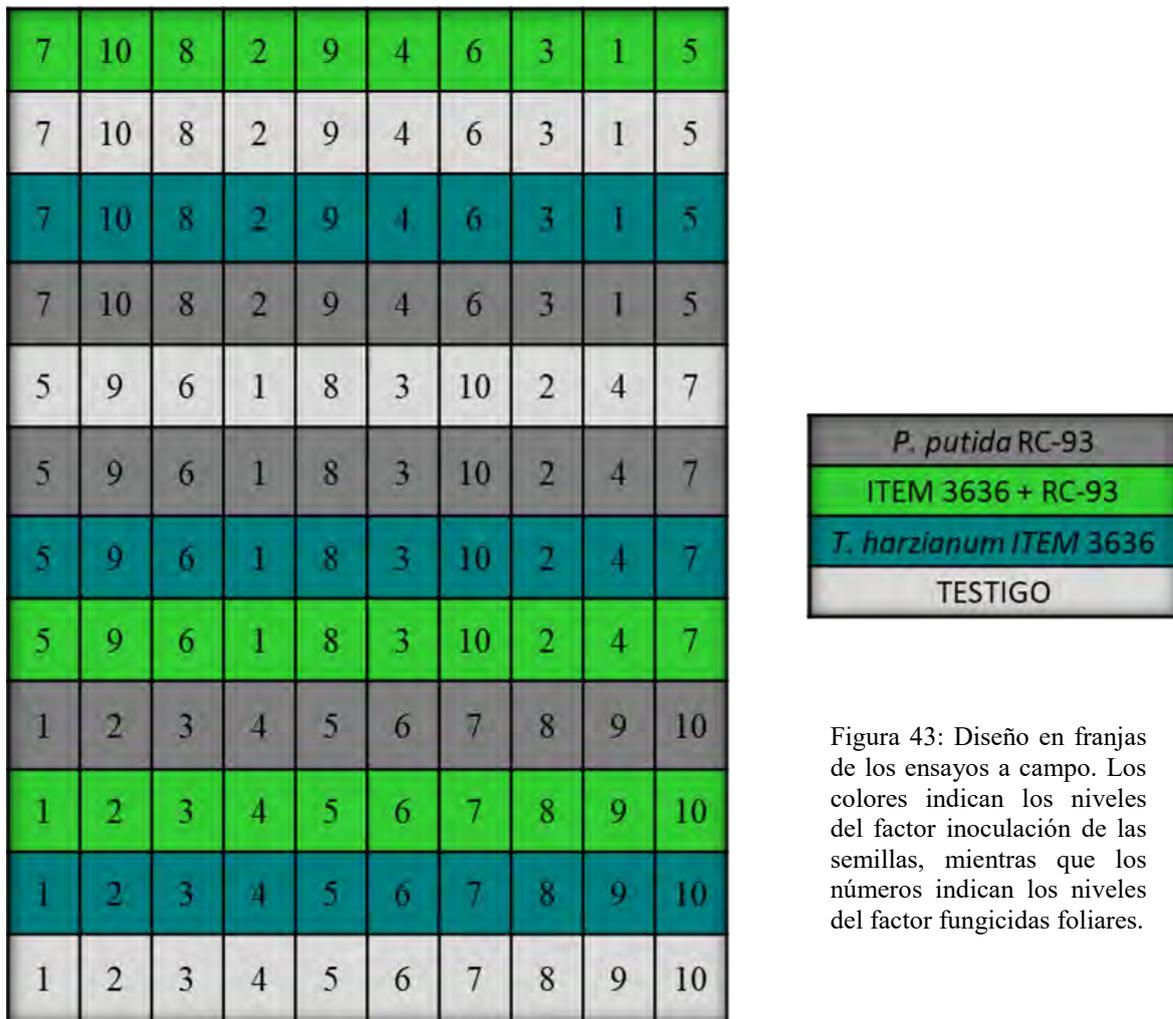


Figura 43: Diseño en franjas de los ensayos a campo. Los colores indican los niveles del factor inoculación de las semillas, mientras que los números indican los niveles del factor fungicidas foliares.

En los niveles 2, 5 y 8, se empleó el Fungicida Opera® de BASF, para el maní se recomienda una dosis de 750 cm³/ha, iniciando los tratamientos ante la aparición de las primeras manchas, y realizando las posteriores aplicaciones cada 21 a 28 días. Su composición es: epoxiconazol + pyraclostrobin, 5% y 13,3% p/v (gr/100ml) respectivamente. Epoxiconazol (triazol) es sistémico, con actividad preventiva, curativa y erradicante contra Ascomicetes y Basidiomicetes, mientras que pyraclostrobin (estrobilurina), tiene actividad traslaminar, con acción preventiva, curativa y erradicante, sobre la misma clase de patógenos más Oomicetos. El primero actúa como inhibidor de la biosíntesis del ergosterol y el segundo como inhibidor del transporte de electrones en las mitocondrias de las células fúngicas, inhibiendo la formación del ATP.

En 3, 6 y 9, se utilizó el Fungicida Orquesta Ultra® de BASF; la dosis recomendada es 1200 cm³/ha., e iniciar las aplicaciones con la aparición de las primeras manchas y continuar las pulverizaciones durante el ciclo del cultivo, con un intervalo de 21 a 28 días. Los principios activos que lo componen son pyraclostrobin y epoxiconazole 8,5 y 5 gr/100 ml y fluxapyroxad (5 gr/100ml). Este último es una carboxamida, con actividad traslaminar y acción preventiva y curativa, inhibe la succinato dehidrogenasa (enzima involucrada en la respiración mitocondrial), interrumpiendo el abastecimiento de energía en los hongos, tiene una residualidad de hasta 28 días.

Para 4, 7 y 10, se utilizó el fungicida Rothalonil® de ROTAM, la dosis recomendada para maní es 1200-1750 cm³/ha, comenzando cuando las condiciones ambientales sean favorables al desarrollo de la enfermedad, repitiendo a intervalos de 10-14 días. El producto se compone de clorotalonil 72 gr, completando 100 ml con inertes y coadyuvantes. Actúa por contacto, con actividad preventiva, afecta el metabolismo celular de algunos hongos produciendo el bloqueo o inhibición de varios procesos metabólicos importantes, como la producción de energía, la transformación de ácidos grasos y de proteínas, y el metabolismo de los azúcares (CASAFE, 2021).



Figura 44: Ensayo de campo correspondiente a la campaña 2018/19. Posterior a la siembra (Vicuña Mackenna) y en pleno crecimiento del cultivo (General Cabrera).

1.2. Variables evaluadas

1.2.1. Ensayos de campo campaña 2017/18

Por falta de condiciones predisponentes para viruela, solo se pudieron evaluar parámetros de rendimiento. Al momento de la cosecha, se arrancaron las plantas de un metro cuadrado

por cada repetición, se cosecharon las vainas y se las dejó secando hasta llegar a una humedad estable, aproximadamente 9%. Luego se pesaron las vainas y posteriormente se tomaron 100 gr y se pelaron para obtener el peso de los granos, y finalmente esos granos se pasaron por zaranda de tajo de 7,5 mm para tener el peso de granos calidad confitería. Los valores obtenidos (gr/m^2) fueron llevados a kg/ha para estimar los respectivos rendimientos.

1.2.2. Ensayos de campo campaña 2018/19

A diferencia del año previo, por condiciones de humedad adecuadas para el desarrollo de la enfermedad, se pudo cuantificar su intensidad, al igual que los parámetros productivos.

Se tomaron dos ramas laterales en los surcos centrales de cada repetición (parcela) en el momento en que se comenzaron a ver síntomas de la enfermedad, y se repitió dicho muestreo y cuantificación a los 25 días en GC, mientras que en VM solo se realizó un muestreo previo a la cosecha, debido a la menor presión de la enfermedad. En ambas localidades se evaluó la incidencia y severidad total de la enfermedad; en GC también se pudo calcular la tasa de incremento y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), por tener más de una medición de severidad.

La incidencia de la enfermedad representa el porcentaje de folíolos enfermos (con síntomas), respecto al total de folíolos evaluados. La severidad por su parte, representa el porcentaje de tejido enfermo, calculado a través de la ecuación de Plaut y Berger (1980) y la escala diagramática de Shokes *et al.* (1987) citadas previamente (Obj. Específico 1) (Figura 45). En el caso de GC, para el cálculo de la tasa de incremento, se tomó la severidad en cada momento, menos la severidad previa, dividido la cantidad de días transcurridos entre evaluaciones [ej: (severidad previo a la cosecha – severidad 25 días previos) / 25 días], promediando las tasas obtenidas en los distintos períodos. Respecto al ABCPE, se calculó el área debajo de la curva de severidad en función del tiempo para cada tramo entre dos mediciones de severidad y luego se sumaron todas las áreas parciales, obteniendo el área total para cada tratamiento y repetición.

Para las variables productivas, se procedió del mismo modo que en los ensayos de la campaña anterior, estimando nuevamente el rendimiento en vainas, granos totales y granos calidad confitería.



Figura 45: Ramas laterales y evaluación de viruela mediante escala diagramática de Shokes *et al.* (1987).

1.2.3. Ensayos de campo campaña 2019/20

Para la campaña 2019/20 (Figura 46), del mismo modo que para la campaña previa, se pudo cuantificar la enfermedad, según su incidencia y severidad, y en el caso de GC también por tasa de incremento y ABCPE. Respecto a las variables productivas, se siguió la misma metodología de muestreo, procesamiento y análisis que en los dos años anteriores.



Figura 46: Lotes de maní correspondientes a los ensayos de campo de la campaña 2019/20. A la izquierda Vicuña Mackenna, a la derecha General Cabrera.

2. RESULTADOS

Con el objetivo de estudiar el efecto de los bioformulados aplicados a las semillas de maní y los fungicidas de síntesis química al follaje respecto a la intensidad de la viruela tardía y el rendimiento del cultivo, se trabajó en dos localidades y tres años, abarcando un total de seis ensayos. Los resultados se organizaron en primer término por campaña agrícola y luego por localidad.

2.1. Ensayos de campo campaña 2017/18

Debido a la escasez de precipitaciones, no hubo condiciones favorables para el desarrollo de la viruela tardía, por lo que la enfermedad no se presentó en ninguna de las localidades en que se realizaron los ensayos. Por tal motivo, solo se pudieron evaluar los parámetros productivos: rendimiento en vainas, granos totales y granos tamaño confitería.

2.1.1. General Cabrera

Al analizar la producción en esta localidad, se encontró interacción entre los factores inoculación a las semillas (de ahora en adelante también llamado curasemilla) y fungicidas foliares respecto a la variable rendimiento en vainas. Se observaron dos grupos con diferencias estadísticamente significativas entre sus rendimientos, sin embargo, esos tratamientos no estuvieron compuestos por un determinado nivel de fungicida y de curasemilla, que permita establecer una clara relación entre los mismos y el rendimiento (punto X.5.1, anexos), asumiendo que dichas diferencias pueden haber sido consecuencia del azar (más allá de los errores tenidos en cuenta en el análisis estadístico), relacionadas con diferencias en el microambiente de las plantas y compensaciones del cultivo. Por tal motivo se analizaron ambos factores por separado, como se hizo también para los rendimientos en granos totales y granos tamaño confitería, donde efectivamente no hubo interacción. A su vez, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los curasemillas, ni entre los fungicidas para ninguno de los tres parámetros evaluados (Tablas 17 y 18).

Tabla 17: Rendimientos de maní (kg/ha \pm error estándar) según curasemillas. General Cabrera campaña 2017/18

Curasemilla	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
C	1594,00 \pm 78,23 a	717,72 \pm 40,22 a	633,59 \pm 35,63 a
P	1630,00 \pm 78,90 a	817,65 \pm 47,91 a	716,22 \pm 44,39 a
T	1573,00 \pm 75,94 a	757,63 \pm 46,15 a	656,82 \pm 39,32 a
TP	1582,00 \pm 56,68 a	765,87 \pm 38,57 a	669,89 \pm 35,70 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Tabla 18: Rendimientos de maní (kg/ha \pm error estándar) según fungicidas. General Cabrera campaña 2017/18

Fungicidas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
1	1481,67 \pm 135,55 a	654,50 \pm 57,51 a	572,41 \pm 50,50 a
2	1565,00 \pm 110,61 a	709,22 \pm 56,53 a	631,15 \pm 55,92 a
3	1798,33 \pm 76,35 a	932,34 \pm 53,72 a	836,53 \pm 52,15 a
4	1521,67 \pm 150,37 a	706,52 \pm 78,87 a	621,54 \pm 73,79 a
5	1743,33 \pm 137,03 a	914,61 \pm 69,90 a	802,71 \pm 54,47 a
6	1490,00 \pm 106,24 a	693,39 \pm 63,68 a	603,27 \pm 60,88 a
7	1450,00 \pm 123,44 a	698,98 \pm 84,34 a	611,19 \pm 66,91 a
8	1564,17 \pm 102,74 a	744,80 \pm 57,52 a	646,93 \pm 46,86 a
9	1619,17 \pm 87,55 a	739,51 \pm 49,62 a	638,33 \pm 49,58 a
10	1714,17 \pm 80,87 a	853,32 \pm 73,52 a	727,24 \pm 70,19 a

1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.1.2. Vicuña Mackenna

En esta localidad no se encontraron interacciones entre ambos factores, como tampoco diferencias estadísticamente significativas dentro de cada uno (entre los diferentes niveles de curasemillas ni entre los niveles de fungicidas), como se muestra en las Tablas 19 y 20 para las tres variables productivas analizadas.

Tabla 19: Rendimientos de maní (kg/ha \pm error estándar) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2017/18

Curasemilla	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
C	5746,67 \pm 312,74 a	4243,68 \pm 237,98 a	3803,23 \pm 222,63 a
P	6353,33 \pm 270,39 a	4694,83 \pm 211,05 a	4244,48 \pm 196,02 a
T	5591,67 \pm 220,95 a	4147,42 \pm 177,45 a	3771,00 \pm 175,05 a
TP	5918,67 \pm 204,71 a	4410,68 \pm 160,89 a	3962,91 \pm 158,16 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Tabla 20: Rendimientos de maní (kg/ha \pm error estándar) según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2017/18

Fungicidas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
1	6693,33 \pm 325,71 a	4944,24 \pm 244,18 a	4449,59 \pm 223,01 a
2	5495,00 \pm 415,18 a	4052,43 \pm 343,75 a	3631,96 \pm 325,38 a
3	5951,67 \pm 366,64 a	4456,28 \pm 252,10 a	4053,77 \pm 258,09 a
4	5685,00 \pm 393,71 a	4250,08 \pm 327,04 a	3777,08 \pm 300,24 a
5	5948,33 \pm 540,82 a	4424,80 \pm 387,23 a	4027,38 \pm 354,29 a
6	6238,33 \pm 554,69 a	4664,65 \pm 439,34 a	4266,13 \pm 441,66 a
7	5747,50 \pm 351,03 a	4163,83 \pm 307,46 a	3706,68 \pm 314,65 a
8	5869,17 \pm 434,29 a	4355,76 \pm 329,17 a	3893,12 \pm 299,96 a
9	6266,67 \pm 321,36 a	4594,00 \pm 229,30 a	4086,59 \pm 197,40 a
10	5130,83 \pm 284,15 a	3835,44 \pm 231,91 a	3561,76 \pm 226,88 a

1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.2. Ensayos de campo campaña 2018/19

Debido a un mejor registro de precipitaciones durante el ciclo del cultivo, la enfermedad se desarrolló en ambas localidades, pudiendo efectuar las mediciones de los parámetros de intensidad, sumados a la estimación de rendimiento.

2.2.1. General Cabrera

No se encontró interacción entre los factores respecto a la intensidad de la enfermedad, por lo que se analizaron ambos por separado. Para el caso del factor curasemillas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación de agua destilada estéril (C) y las suspensiones de *T. harzianum* ITEM 3636 (T), *P. putida* RC-93 (P) o el coinóculo (TP), para ninguna de las variables evaluadas (Tabla 21).

Tabla 21: Intensidad de viruela tardía del maní (*N. personata*) según curasemillas. General Cabrera campaña 2018/19

Curasemillas	Incidencia final (%)	Severidad final (%)	Tasa	ABCPE
C	64,73 ± 4,23 a	10,99 ± 2,38 a	0,22 ± 0,05 a	143,06 ± 30,98 a
P	63,98 ± 4,23 a	9,59 ± 2,20 a	0,19 ± 0,04 a	122,86 ± 27,69 a
T	64,39 ± 4,38 a	11,96 ± 2,63 a	0,24 ± 0,05 a	153,92 ± 33,24 a
TP	62,13 ± 4,38 a	10,61 ± 2,34 a	0,21 ± 0,05 a	136,63 ± 30,08 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad. Valores medios ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Por otro lado, al realizar los análisis de estos parámetros según los diferentes niveles del factor fungicidas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los mismos. En todos los casos, el control (1) fue el que registró los valores más altos para la enfermedad, siguiendo un patrón muy similar entre los demás fungicidas, pero sin encontrarse diferencias significativas entre ellos, salvo para la incidencia final (Figura 47). En este caso, se encontró que el fungicida 4 y luego el 10, fueron los que presentaron las incidencias más bajas (77 y 53 % menores respectivamente, relativo al testigo), basándose ambos en la aplicación de clorotalonil en 5 momentos, el resto de los tratamientos tuvieron un comportamiento intermedio, pero siempre muy superior al del control (incidencia al menos 12 % inferior).

En cuanto a la severidad final, tasa de incremento y ABCPE, todos los fungicidas redujeron los registros medios al menos un 55 % en referencia al testigo (Figuras 48 a 50).

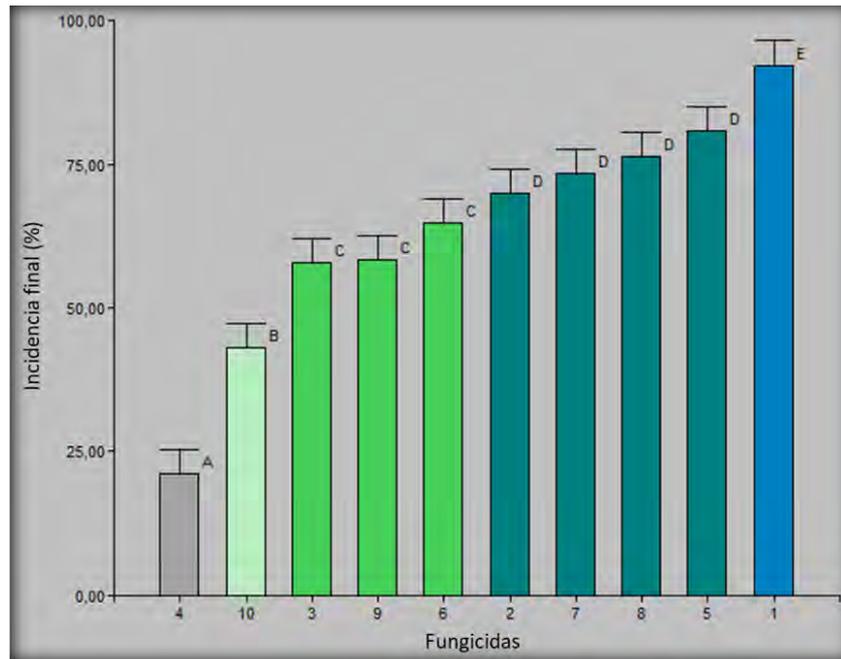


Figura 47: Incidencia final de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

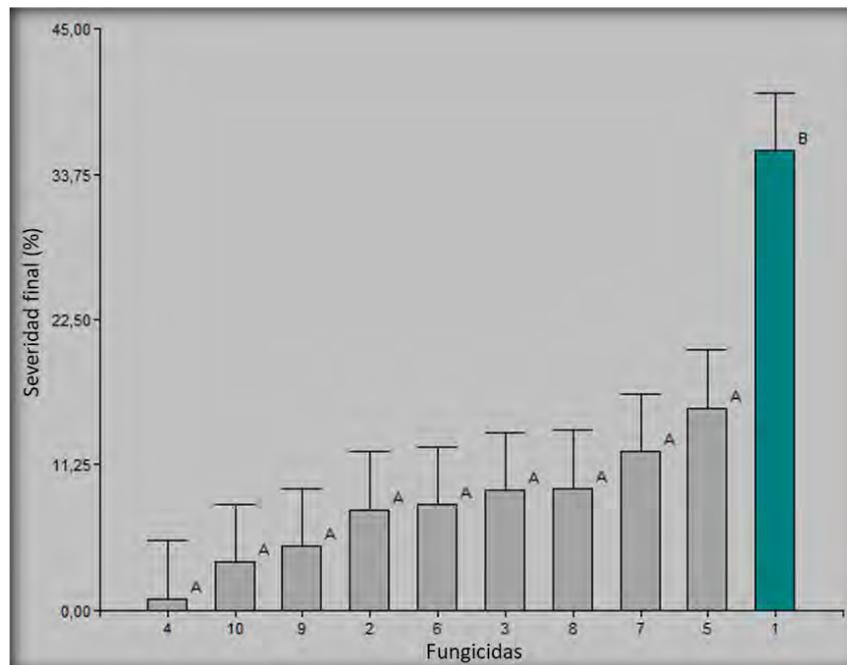


Figura 48: Severidad final de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

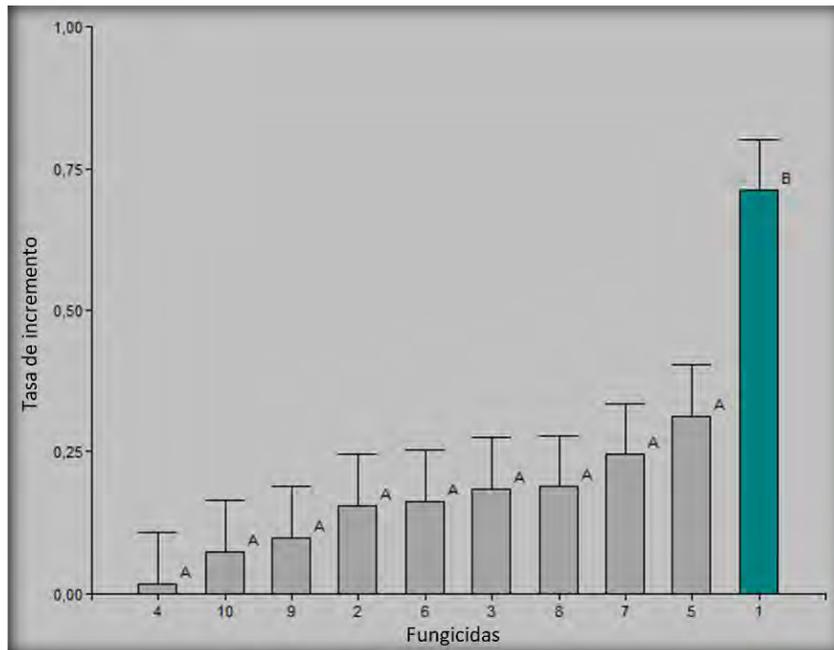


Figura 49: Tasa de incremento (aumento de % de severidad diario) de viruela tardía del maní según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

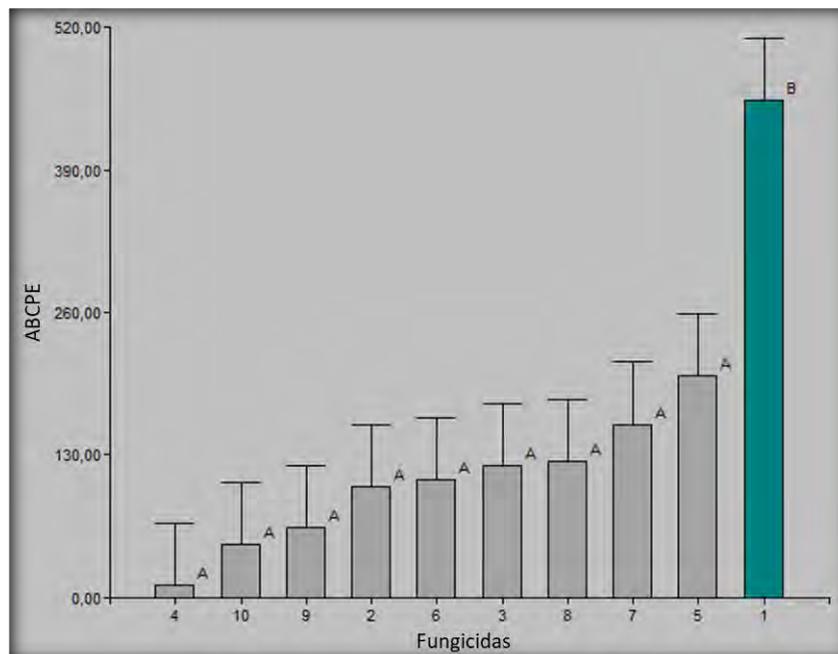


Figura 50: Área bajo la curva de progreso de viruela tardía del maní (ABCPE) según fungicidas. General Cabrera, campaña 2018/19. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras y colores diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

Respecto a las variables productivas, similar a lo que ocurrió en el año previo para esta localidad, cuando se analizó el rendimiento en vainas, se encontró interacción entre factores, pero nuevamente sin una tendencia clara en cuanto a que combinación de curasemillas y fungicidas fue la que mejor se comportó (punto X.5.3, anexos). Por esta razón, se analizaron ambos factores por separado, como también se hizo para las variables rendimiento en granos totales y granos calidad confitería, donde efectivamente no se encontró interacción entre los dos factores al analizar todos sus niveles (Tablas 22 y 23).

Tabla 22: Rendimientos (kg/ha \pm error estándar) según fungicidas. General Cabrera campaña 2018/19

Fungicidas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
1	4890,68 \pm 325,13 a	2812,54 \pm 235,13 a	2559,04 \pm 225,34 a
2	5285,32 \pm 282,87 a	2967,51 \pm 152,75 a	2624,75 \pm 142,20 a
3	5435,37 \pm 251,28 a	3264,74 \pm 201,04 a	2843,58 \pm 192,53 a
4	4670,53 \pm 209,24 a	2652,71 \pm 144,22 a	2316,91 \pm 139,63 a
5	5286,33 \pm 242,70 a	3097,74 \pm 141,33 a	2754,28 \pm 130,56 a
6	4760,49 \pm 199,48 a	2763,40 \pm 118,34 a	2455,55 \pm 110,26 a
7	4807,63 \pm 309,21 a	2603,08 \pm 239,01 a	2204,91 \pm 196,81 a
8	5201,94 \pm 273,14 a	2862,15 \pm 208,67 a	2539,43 \pm 197,66 a
9	5061,14 \pm 333,78 a	2709,58 \pm 230,66 a	2408,47 \pm 222,50 a
10	5607,28 \pm 247,76 a	3079,24 \pm 188,07 a	2769,51 \pm 188,88 a

1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Tabla 23: Rendimientos (kg/ha \pm error estándar) según curasemillas. General Cabrera campaña 2018/19

Curasemillas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
C	4892.92 \pm 153.59	2699.09 \pm 109.10 a	2350.26 \pm 96.40 a
P	5171.05 \pm 168.85	2894.67 \pm 103.73 a	2583.23 \pm 99.47 a
T	5252.18 \pm 178.30	2997.11 \pm 121.68 a	2667.92 \pm 114.54
TP	5086.53 \pm 192.88	2934.21 \pm 147.24 a	2589.17 \pm 139.86

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Sin embargo, al analizar estos parámetros teniendo en cuenta los niveles del factor curasemillas de a pares, se observó que la inoculación de las semillas con la cepa *T. harzianum* ITEM 3636, alcanzó valores de rendimiento mas altos que el control, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el rendimiento en granos calidad confitería, los de mayor valor comercial (punto X.5.3, anexos)

2.2.2. Vicuña Mackenna

En esta localidad no se encontró interacción entre los factores curasemillas y fungicidas, ni diferencias estadísticamente significativas entre los niveles del factor curasemillas para los dos parámetros evaluados de intensidad de la enfermedad (Tabla 24), donde los valores oscilaron el 10 % de incidencia y el 0,20 % de severidad.

Tabla 24: Intensidad de viruela tardía del maní (*N. personata*) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2018/19

Curasemillas	Incidencia (%)	Severidad (%)
C	8,95 ± 2,31 a	0,16 ± 0,05 a
P	10,41 ± 2,57 a	0,18 ± 0,06 a
T	11,11 ± 2,95 a	0,21 ± 0,10 a
TP	13,26 ± 3,33 a	0,25 ± 0,08 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Valores medios ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Cuando se analizó el efecto de los fungicidas, se encontró una mayor incidencia y severidad de la enfermedad en el control sin fungicidas (1), sin diferencias estadísticamente significativas entre el resto de los fungicidas (Figuras 51 y 52), reduciendo al menos un 36 % la incidencia y 55 % la severidad respecto al control.

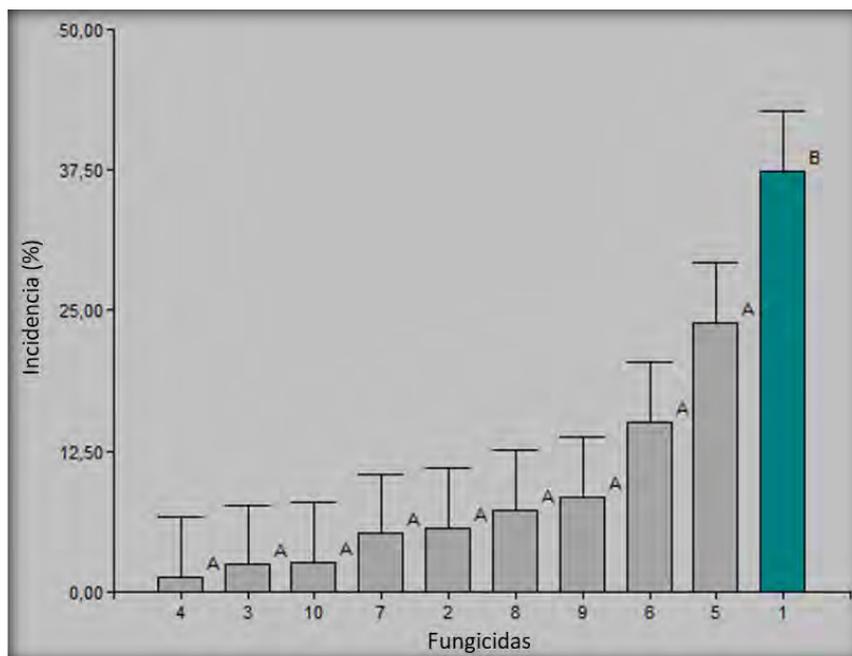


Figura 51: Incidencia de viruela tardía del maní según fungicidas. Vicuña Mackenna, campaña 2018/19. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras y colores distintos indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

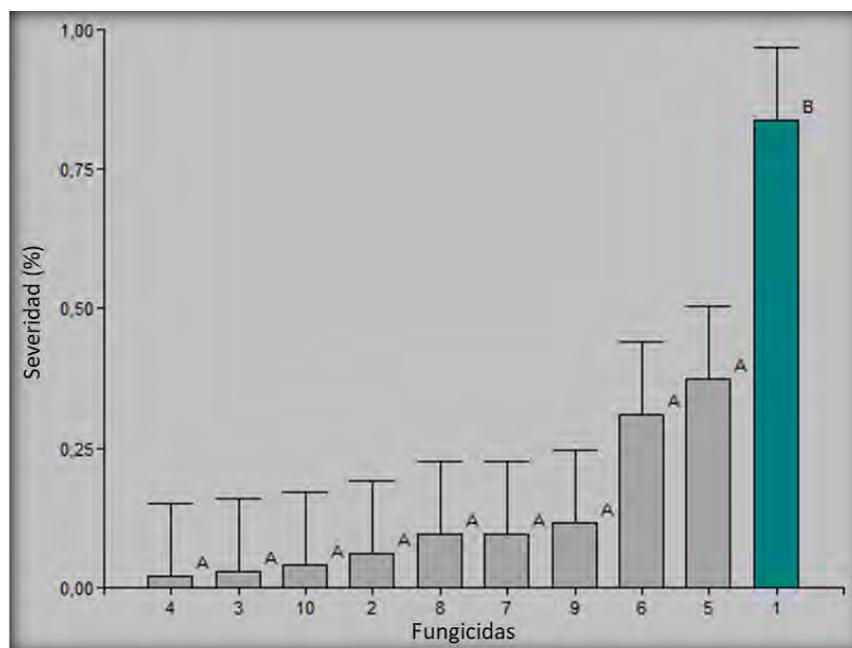


Figura 52: Severidad de viruela tardía del maní según fungicida. Vicuña Mackenna, campaña 2018/19. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras y colores distintos indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

Respecto a las variables de producción, no se encontró interacción entre los factores, ni se observaron diferencias entre los diferentes niveles dentro de curasemillas o fungicidas (Tablas 25 y 26).

Tabla 25: Rendimientos (kg/ha \pm error estándar) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2018/19

Curasemillas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
C	5424,71 \pm 148,42 a	3645,01 \pm 112,04 a	3059,79 \pm 114,42 a
P	4947,71 \pm 100,58 a	3373,28 \pm 88,73 a	2796,71 \pm 87,33 a
T	5404,41 \pm 160,44 a	3638,43 \pm 123,34 a	3034,03 \pm 117,67 a
TP	5476,14 \pm 151,82 a	3785,09 \pm 105,02 a	3175,08 \pm 97,96 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Tabla 26: Rendimientos (kg/ha \pm error estándar) según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2018/19

Fungicidas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
1	5521,57 \pm 233,56 a	3829,97 \pm 193,52 a	3311,31 \pm 199,49 a
2	4884,91 \pm 249,97 a	3261,48 \pm 172,10 a	2723,93 \pm 151,63 a
3	5356,58 \pm 215,64 a	3653,43 \pm 170,63 a	3059,11 \pm 174,07 a
4	5436,50 \pm 191,94 a	3621,89 \pm 163,57 a	3016,40 \pm 174,44 a
5	5391,00 \pm 207,11 a	3635,61 \pm 128,39 a	3010,80 \pm 116,74 a
6	5569,92 \pm 333,47 a	3818,41 \pm 229,23 a	3156,82 \pm 199,97 a
7	5033,73 \pm 108,81 a	3483,54 \pm 95,02 a	2949,56 \pm 94,66 a
8	5424,63 \pm 220,37 a	3655,15 \pm 188,56 a	3024,54 \pm 188,67 a
9	5028,73 \pm 259,91 a	3361,89 \pm 210,08 a	2717,71 \pm 218,39 a
10	5484,85 \pm 212,42 a	3783,14 \pm 132,17 a	3193,85 \pm 99,17 a

1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.3. Ensayos de campo campaña 2019/20

Como ocurrió en el año previo, debido a las condiciones ambientales, básicamente precipitaciones más abundantes que en el primer año, hubo un desarrollo de la viruela tardía, lo que permitió la cuantificación de su intensidad, junto con la de los parámetros productivos del cultivo.

2.3.1. General Cabrera

Al analizar los resultados de intensidad de la enfermedad, salvo para incidencia, se encontró interacción significativa entre los factores curasemillas y fungicidas para los parámetros evaluados, severidad, tasa de incremento y ABCPE, estando fuertemente ligados al efecto de los niveles del factor fungicida, lo que queda plasmado en el punto X.5.5 (anexos). Solo se pudo establecer con claridad tres grupos que se que tuvieron valores estadísticamente mayores para las tres variables: las combinaciones de semillas inoculadas con *P. putida* RC-93 (P), el coinóculo (TP), o sin inocular (C) con el nivel 1 de fungicidas (testigo), que registraron los valores más altos, seguidos por la inoculación a la semilla con *T. harzianum* ITEM 3636 (T) combinado con 1 y T combinado con 5 (pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha por dos aplicaciones). Teniendo en cuenta lo anterior, y para una simplificación de su análisis, los resultados se presentan considerando ambos factores por separado.

Cuando se analizaron los bioformulados aplicados a las semillas (Tabla 27), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y las suspensiones de *P. putida* RC-93, *T. harzianum* ITEM 3636 y el coinóculo, para ninguna de las variables evaluadas.

Tabla 27: Intensidad de viruela tardía del maní (*N. personata*) según curasemillas. General Cabrera campaña 2019/20

Curasemillas	Incidencia final (%)	Severidad final (%)	Tasa	ABCPE
C	64,01 ± 3,54 a	27,66 ± 4,47 a	0,53 ± 0,09 a	387,45 ± 60,20 a
P	62,67 ± 3,44 a	25,47 ± 4,41 a	0,49 ± 0,08 a	357,93 ± 59,24 a
T	66,72 ± 3,40 a	25,41 ± 4,32 a	0,49 ± 0,08 a	358,75 ± 58,89 a
TP	61,06 ± 3,21 a	25,46 ± 4,29 a	0,49 ± 0,08 a	355,56 ± 57,85 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad. Valores medios ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

Respecto al factor fungicidas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el testigo (1) y el resto de los niveles, para todos los parámetros evaluados de la enfermedad (Tabla 28). A su vez, se observó que clorotalonil (1400 cm³/ha) en tres y cinco aplicaciones (niveles 7 y 4, respectivamente), tuvieron la menor incidencia final de la enfermedad, con valores inferiores al 53 % respecto a 97 % en el testigo (45 % más bajos aproximadamente, en términos relativos). Por otro lado el fungicida 4, junto con el 3 y el 9 (fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin, 1200 y 720 cm³/ha, respectivamente en cuatro aplicaciones), mostraron los valores más bajos de severidad final, tasa y ABCPE, alrededor de un 90 % inferiores a los registrados para el testigo (tomando los valores de este como el 100%).

Tabla 28: Intensidad de viruela tardía del maní (*N. personata*) según fungicidas. General Cabrera campaña 2019/20

Fungicidas	Incidencia final (%)	Severidad final (%)	Tasa	ABCPE
1	97,58 ± 1,67 c	84,70 ± 5,53 c	1,63 ± 0,11 c	1148,96 ± 76,13 c
2	62,93 ± 3,40 b	25,85 ± 2,43 b	0,56 ± 0,05 b	363,58 ± 32,70 b
3	60,85 ± 3,91 b	7,24 ± 1,44 a	0,14 ± 0,03 a	101,58 ± 19,30 a
4	44,60 ± 6,13 a	6,47 ± 2,83 a	0,13 ± 0,05 a	89,40 ± 36,61 a
5	61,32 ± 4,56 b	33,27 ± 4,48 b	0,64 ± 0,09 b	470,03 ± 58,31 b
6	67,48 ± 3,70 b	20,88 ± 2,83 b	0,40 ± 0,05 b	302,45 ± 37,57 b
7	52,51 ± 3,07 a	27,21 ± 2,56 b	0,52 ± 0,05 b	395,75 ± 34,18 b
8	60,35 ± 2,59 b	26,56 ± 1,28 b	0,51 ± 0,02 b	375,36 ± 19,95 b
9	63,05 ± 4,82 b	9,27 ± 1,51 a	0,18 ± 0,03 a	128,29 ± 20,46 a
10	65,49 ± 3,85 b	18,51 ± 1,30 b	0,36 ± 0,03 b	273,85 ± 18,06 b

Valores medios ± error estándar. ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

En cuanto al rendimiento, no hubo interacción entre los factores; tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los curasemillas, ni entre los fungicidas aplicados (Tablas 29 y 30). Sin embargo, dentro de este último factor, puede observarse que el testigo (1) tuvo una tendencia a valores más bajos de producción en los tres parámetros evaluados, lo que podría estar reflejando el efecto de la mayor intensidad de la enfermedad respecto a los otros fungicidas.

Tabla 29: Rendimientos estimados (kg/ha \pm error estándar) según curasemillas. General Cabrera campaña 2019/20

Curasemilla	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos calidad confitería
C	3822,27 \pm 226,95 a	1697,54 \pm 130,40 a	1405,56 \pm 114,00 a
P	4132,00 \pm 229,48 a	1860,81 \pm 122,16 a	1538,54 \pm 96,53 a
T	3847,13 \pm 165,13 a	1810,39 \pm 85,46 a	1465,33 \pm 83,91 a
TP	3896,27 \pm 171,40 a	1861,83 \pm 116,14 a	1525,08 \pm 99,73 a

C: control. P: *P. putida*. RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Tabla 30: Rendimientos estimados (kg/ha \pm error estándar) según fungicidas. General Cabrera campaña 2019/20

Fungicida	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos calidad confitería
1	3173,00 \pm 259,12 a	1375,87 \pm 147,17 a	1024,53 \pm 124,03 a
2	4070,50 \pm 280,10 a	1855,68 \pm 189,88 a	1573,64 \pm 173,11 a
3	4257,83 \pm 276,01 a	1958,57 \pm 140,88 a	1595,91 \pm 122,14 a
4	4266,83 \pm 348,80 a	1987,49 \pm 171,71 a	1659,52 \pm 148,89 a
5	3786,00 \pm 388,46 a	1816,48 \pm 239,60 a	1461,39 \pm 165,12 a
6	4225,00 \pm 284,31 a	1780,98 \pm 153,78 a	1443,38 \pm 142,29 a
7	3832,33 \pm 282,02 a	1887,57 \pm 164,82 a	1566,76 \pm 151,90 a
8	3768,50 \pm 311,90 a	1728,73 \pm 166,74 a	1427,05 \pm 152,69 a
9	3767,00 \pm 259,67 a	1701,77 \pm 156,11 a	1410,86 \pm 142,90 a
10	4097,17 \pm 402,79 a	1983,28 \pm 238,49 a	1673,24 \pm 189,97 a

1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

2.3.2. Vicuña Mackenna

Al analizar los resultados, no se encontró interacción significativa entre los factores curasemillas y fungicidas para ninguno de los parámetros evaluados, tanto de intensidad de la enfermedad como de rendimiento, por lo que se analizaron de manera separada.

La incidencia y severidad de la enfermedad, no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas suspensiones que conforman el factor curasemilla, registrando valores muy bajos en todos los casos (2,97 a 4,49 % de incidencia y 0,02 a 0,03 % de severidad) (Tabla 31).

Tabla 31: Intensidad de viruela tardía según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20

Curasemillas	Incidencia (%)	Severidad (%)
C	2,97 ± 0,66 a	0,02 ± 0,01 a
P	4,49 ± 1,05 a	0,03 ± 0,01 a
T	3,80 ± 1,60 a	0,03 ± 0,01 a
TP	3,65 ± 0,81 a	0,03 ± 0,01 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Valores medios ± error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Respecto al factor fungicidas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el testigo (1 – sin fungicida) y el resto de los niveles tanto para la incidencia, como la severidad de la enfermedad (Tabla 32). También se encontraron diferencias entre los principios activos, donde la aplicación de fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin (1200 cm³/ha) en dos momentos (6) y clorotalonil (1400 cm³/ha) en tres momentos (7), registraron los mayores valores de incidencia de la enfermedad, después del testigo. Los valores fueron muy bajos comparados con la otra localidad, con registros medios entre 0,91 y 12,11 % de incidencia.

Al analizar la severidad de la viruela, se encontró que nuevamente el nivel 7, tuvo el valor mas alto después del testigo, seguido por 6, 5 y 8 (pyraclostrobin + epoxiconazole, 750 y 450 cm³/ha, en dos y cuatro aplicaciones respectivamente) y 10 (clorotalonil 840 cm³/ha, por cinco aplicaciones). Sin embargo, en todos los casos con valores muy bajos, entre 0,003 y 0,09 % de severidad.

Tabla 32: Intensidad de la viruela tardía según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20

Fungicidas	Incidencia (%)	Severidad (%)
1	12,11 ± 2,35 d	0,090 ± 0,020 d
2	1,12 ± 0,38 a	0,010 ± 0,003 a
3	1,16 ± 0,43 a	0,004 ± 0,003 a
4	1,24 ± 0,51 a	0,010 ± 0,004 a
5	2,93 ± 0,80 a	0,020 ± 0,010 b
6	4,60 ± 0,95 b	0,030 ± 0,010 b
7	7,70 ± 1,50 c	0,060 ± 0,010 c
8	2,31 ± 0,61 a	0,020 ± 0,010 b
9	0,91 ± 0,22 a	0,003 ± 0,002 a
10	3,20 ± 1,05 a	0,030 ± 0,010 b

Valores medios ± error estándar. 1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

Por otro lado, al igual que lo ocurrido en General Cabrera, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al rendimiento, entre los diferentes curasemillas y ni entre los fungicidas aplicados (Tablas 33 y 34).

Tabla 33: Rendimientos estimados (kg/ha ± error estándar) según curasemillas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20

Tratamiento	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos calidad confitería
C	4130,27 ± 161,44 a	3043,59 ± 122,33 a	2453,46 ± 130,44 a
P	4378,87 ± 174,66 a	3279,22 ± 136,33 a	2629,81 ± 125,12 a
T	4581,20 ± 201,34 a	3436,62 ± 153,77 a	2889,18 ± 139,42 a
TP	4040,13 ± 202,64 a	2994,29 ± 157,12 a	2443,58 ± 134,78 a

C: control. P: *P. putida* RC-93. T: *T. harzianum* ITEM 3636. TP: coinóculo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05), según test DGC.

Sin embargo, tal como ocurrió en el ensayo de General Cabrera en la campaña 2018/19, al analizar los niveles dentro del factor curasemillas de a pares, se encontró que la aplicación de la cepa *T. harzianum* ITEM 3636 a las semillas, permitió conseguir valores de rendimiento mas altos, con diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) para el rendimiento en granos confitería, respecto al testigo (punto X.5.6, anexos).

Al igual que lo expresado para la otra localidad en la misma campaña, se observó que el testigo (1) tuvo una tendencia a valores más bajos para los tres parámetros de rendimiento (Tabla 34), reflejando posiblemente el efecto de la mayor intensidad de la enfermedad.

Tabla 34: Rendimientos estimados (kg/ha \pm error estándar) según fungicidas. Vicuña Mackenna campaña 2019/20

Fungicidas	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos calidad confitería
1	3740,83 \pm 381,77 a	2757,53 \pm 291,25 a	2207,24 \pm 266,90 a
2	3860,50 \pm 216,44 a	2887,36 \pm 173,12 a	2375,89 \pm 148,48 a
3	4776,33 \pm 388,17 a	3578,22 \pm 306,50 a	2882,54 \pm 252,13 a
4	4525,00 \pm 309,09 a	3328,84 \pm 236,48 a	2757,48 \pm 238,77 a
5	4134,50 \pm 211,37 a	3098,22 \pm 157,67 a	2466,34 \pm 132,72 a
6	4317,83 \pm 301,42 a	3230,96 \pm 234,67 a	2615,34 \pm 239,01 a
7	4213,83 \pm 223,27 a	3165,64 \pm 162,48 a	2552,12 \pm 198,94 a
8	4541,67 \pm 272,98 a	3404,59 \pm 210,88 a	2860,64 \pm 184,75 a
9	4621,33 \pm 332,53 a	3442,33 \pm 259,55 a	2878,64 \pm 251,04 a
10	4094,33 \pm 222,96 a	2990,59 \pm 175,27 a	2443,85 \pm 148,64 a

1: testigo. 2: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 4 aplicaciones. 3: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 4 aplicaciones. 4: clorotalonil 1400 cm³/ha 5 aplicaciones. 5: pyraclostrobin + epoxiconazole 750 cm³/ha 2 aplicaciones. 6: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 1200 cm³/ha 2 aplicaciones. 7: clorotalonil 1400 cm³/ha 3 aplicaciones. 8: pyraclostrobin + epoxiconazole 450 cm³/ha 4 aplicaciones. 9: fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin 720 cm³/ha 4 aplicaciones. 10: clorotalonil 840 cm³/ha 5 aplicaciones. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según test DGC.

Si se comparan los resultados de intensidad de la enfermedad a nivel de ensayo, contemplando la totalidad de las muestras (120 = 40 tratamientos por tres repeticiones) para cada localidad y campaña (Tabla 35), se puede observar que en General Cabrera se llegó a valores medios y máximos más altos que en Vicuña Mackenna para ambas campañas.

Tabla 35: Medidas de resumen de la intensidad de la enfermedad a nivel de ensayo

Ensayo	Incidencia (%)	Severidad (%)
GC, 2018/19	63,81 \pm 2,13 (4,55 - 100)	10,79 \pm 1,18 (0,06 - 73,67)
GC, 2019/20	63,62 \pm 1,69 (16,35 - 100)	26,00 \pm 2,16 (0,30 - 100)
VM, 2018/19	10,93 \pm 1,40 (0 - 69,94)	0,20 \pm 0,04 (0 - 2,86)
VM, 2019/20	3,73 \pm 0,45 (0 - 29,58)	0,03 \pm 0,004 (0 - 0,24)

Valores medios \pm error estándar (mínimo - máximo). GC: General Cabrera. VM: Vicuña Mackenna.

Por otra parte, al resumir los resultados de producción a nivel de ensayo (Tabla 36), se evidencian valores mas elevados para Vicuña Mackenna en las tres campañas, para las tres variables estimadas: rendimiento en vainas, en granos totales y en granos tamaños confitería.

Tabla 36: Medidas de resumen de los rendimientos (kg/ha \pm error estándar) a nivel de ensayo

Ensayo	Rendimiento en vainas	Rendimiento en granos totales	Rendimiento en granos confitería
GC, 2017/18	1594,75 \pm 36,10	764,72 \pm 21,67	669,13 \pm 19,48
GC, 2018/19	5100,67 \pm 86,76	2881,27 \pm 60,89	2547,64 \pm 57,26
GC, 2019/20	3924,42 \pm 99,62	1807,64 \pm 57,00	1483,63 \pm 49,17
VM, 2017/18	5902,58 \pm 128,93	4374,15 \pm 100,11	3945,40 \pm 95,11
VM, 2018/19	5313,24 \pm 72,87	3610,45 \pm 55,04	3016,40 \pm 53,38
VM, 2019/20	4282,62 \pm 93,79	3188,43 \pm 72,52	2604,01 \pm 67,49

GC: General Cabrera. VM: Vicuña Mackenna.

3. DISCUSIÓN

Durante el primer año de ensayos a campo (campaña 2017/18), no se encontraron síntomas de viruela tardía debido a la escasez de precipitaciones durante el ciclo del cultivo en ambas localidades, 263 mm en General Cabrera y 298 mm en Vicuña Mackenna. Considerando que el patógeno *N. personata* necesita precipitaciones para su dispersión y una canopia húmeda para poder infectar y desarrollar la enfermedad (Marinelli *et al.*, 2017), las condiciones ambientales de esta campaña, no propiciaron el desarrollo del patógeno. En los dos años subsiguientes, con condiciones favorables para la enfermedad, se observaron síntomas en ambas localidades; sin embargo, la intensidad de la enfermedad en General Cabrera fue muy superior a la registrada en Vicuña Mackenna en ambas campañas. Esto se debe al historial de uso de los lotes, en el primer caso, con más de cincuenta años de producción de maní, lo que hace que haya mayor cantidad de inóculo, y ante condiciones ambientales favorables, la enfermedad normalmente se presenta con niveles de intensidad mas elevados que en los campos cercanos a Vicuña Mackenna, que pertenecen a una zona con menor historial de uso para este cultivo (Giayetto *et al.*, 2017).

En los ensayos de las campañas 2018/19 y 2019/20 en ambas localidades, la pulverización con los diferentes principios activos, en distintas dosis y número de aplicaciones, logró una disminución de la incidencia y severidad de la enfermedad y de su tasa de incremento y ABCPE (solo en General Cabrera), respecto al testigo químico sin fungicidas; estos resultados fueron observados en ensayos a campo en estudios previos, para esta misma zona (Oddino *et al.*, 2018), al igual que en otros países (Culbreath *et al.*, 2018).

En General Cabrera en la campaña 2018/19 la aplicación de clorotalonil a la dosis recomendada (1400 cm³/ha) en cinco momentos (4), logró la menor incidencia de la enfermedad, seguido por este mismo tratamiento, solo que al 60% de la dosis anterior (840 cm³/ha) (10); sin embargo, es importante tener en cuenta el riesgo que implica el uso de subdosis de fungicidas, frente a la posible generación de resistencia en el patógeno (van den Bosch *et al.*, 2011). Respecto a la severidad, tasa de incremento y ABCPE, solo se encontraron diferencias entre no aplicar fungicidas (1) y la aplicación de cualquiera de ellos en sus diferentes combinaciones, aunque se pudo observar una tendencia similar, posicionando a los tratamientos 4 y 10 nuevamente como los mejores, en coincidencia con otros trabajos que contemplaron ensayos a campo en la misma zona productora de maní (Monguillot *et al.*, 2020; Giordano *et al.*, 2021b).

En el caso de la localidad de Vicuña Mackenna durante la campaña 2018/19, del mismo modo que en el ensayo anterior, solo se registró un efecto de los fungicidas; tanto para la incidencia como para la severidad, la única diferencia observada fue entre el testigo y el resto de los niveles de este factor. Cabe destacar igualmente, que se encontró una tendencia en el comportamiento de los diferentes niveles del factor fungicidas, donde nuevamente se posicionaron los niveles 4 y 10 como los de menor intensidad de la enfermedad.

Respecto a los datos de la localidad de General Cabrera en la campaña 2019/20, se encontró una interacción entre curasemillas y fungicidas para la severidad, tasa de incremento y ABCPE, pero evidentemente ese resultado estuvo correlacionado con el efecto del factor fungicida, ya que las combinaciones del testigo (1) con los distintos curasemillas, fueron los que presentaron la mayor diferencia con el resto, sin poder encontrar una relación entre fungicidas y curasemillas con ventaja frente a la enfermedad. El fungicida que registró la menor incidencia, fue clorotalonil 1400 cm³/ha en 3 y 5 aplicaciones (niveles 7 y 4). En cuanto a la severidad, tasa de incremento y ABCPE, no hubo diferencias entre los niveles, salvo respecto al testigo, aunque nuevamente hubo una tendencia del nivel 4 del factor fungicidas, como uno de los mejores.

Finalmente, al analizar los datos de la localidad de Vicuña Mackenna para la campaña 2019/20, la incidencia y la severidad registradas llegaron a valores muy bajos, como se mencionó previamente por el historial de la zona, sumado a las menores precipitaciones respecto a la campaña previa en la misma localidad. Para ambas variables, el fungicida 6 (fluxapyroxad + pyraclostrobin + epoxiconazole, 1200 cm³/ha, 2 aplicaciones) y 7 (clorotalonil 1400 cm³/ha, 3 aplicaciones) estuvieron entre los que lograron un menor control de la enfermedad, posiblemente por un menor número de aplicaciones que en el resto de los niveles (3 y 5 aplicaciones, respectivamente).

En forma general, en todos los ensayos en que se pudo evaluar la enfermedad (campañas 2018/19 y 2019/20 en ambas localidades), se encontró que la aplicación de todos los principios activos evaluados, en diferentes dosis y número de aplicaciones, disminuyó la intensidad de la enfermedad respecto al testigo. Entre estos hubo mezclas de estrobilurinas + triazoles (pyraclostrobin + epoxiconazole), que se vienen usando para el manejo de esta enfermedad en lotes de maní comerciales, con mejores resultados que la aplicación de moléculas de ambos grupos por separado, demostrando la importancia de su efecto sinérgico, debido a los diferentes modos de acción (Culbreath *et al.*, 2018; Oddino *et al.*, 2018). En la otra mezcla de principios activos evaluada, se agrega una carboxamida

(fluxapyroxad); pese a que en el presente trabajo no se encontró una mejor performance de estos tratamientos respecto al resto de los fungicidas empleados en la mayoría de los casos, este tipo de mezclas han mostrado mayor eficiencia de control de la enfermedad que las mezclas de triazoles + estrobilurinas (Culbreath *et al.*, 2016; Oddino *et al.*, 2018; Giordano *et al.*, 2021b), encontrando que uno de los principios activos que resalta dentro de este grupo para el control de viruela del maní, ha sido penthiopirad (Culbreath *et al.*, 2020; Monguillot *et al.*, 2020), no contemplado en el presente trabajo.

Para la mayoría de los ensayos aquí descritos, la aplicación del fungicida clorotalonil representó la mejor opción dentro de la herramienta química de control de la enfermedad, lo cual viene siendo plasmado hace un tiempo en diversos trabajos (Culbreath *et al.*, 2009, 2018; Oddino *et al.*, 2018). Este fungicida ha sido la base para el control de viruela del maní en todo el mundo, debido a su reducido riesgo de generar resistencia gracias a sus múltiples modos de acción, con más de 40 años de uso en diferentes patosistemas, sin registros de desarrollo de resistencia (Anco, 2018). Teniendo en cuenta que el uso de esta molécula a nivel mundial, quedó prohibido desde mayo del 2020 (Comisión Europea, 2019), es necesario recurrir a otros principios activos para el control de la enfermedad, sin perder de vista el manejo de la resistencia.

Entre los fungicidas, aquellos con múltiples sitios de acción, como mancozeb, cobre y azufre en mezcla con triazoles, han demostrado un buen control de la enfermedad y podrían reemplazar a clorotalonil, manteniendo un bajo riesgo de disminución de la sensibilidad del patógeno (Culbreath *et al.*, 2019; Giordano *et al.*, 2021b). Incluso principios activos registrados como insecticidas, han sido evaluados frente a esta enfermedad en aplicaciones al surco, tal es el caso del forato, con el que se encontró una significativa disminución de la defoliación, aparentemente debido a una activación de defensas en la planta, colaborando también en la disminución del riesgo de desarrollo de resistencia (Anco *et al.*, 2020b).

Otra de las alternativas al uso exclusivo de fungicidas de síntesis química, es la implementación de un manejo integrado de la enfermedad, que más allá de contribuir con la durabilidad de dicha herramienta, está alineado a las exigencias a nivel mundial, particularmente a países europeos, los principales importadores del maní argentino, que buscan disminuir la dependencia en el uso de pesticidas para una mayor seguridad ambiental y del consumidor. Uno de los enfoques en este punto, es el uso de ACB (Woo *et al.*, 2014).

A lo largo de este trabajo, en los cuatro ensayos realizados a campo en los que se presentó la viruela tardía del maní (GC y VM 2018/19 y 2019/20), no se observó que la aplicación de los bioformulados de *Pseudomona putida* RC-93 y/o *Trichoderma harzianum* ITEM 3636, lograra una disminución de la enfermedad, atribuible a una promoción del crecimiento de la planta o por mecanismo ISR/SAR. En otros trabajos del grupo de investigación con la cepa *T. harzianum* ITEM 3636 aplicada en semilla, se encontró disminución de la intensidad de podredumbre parda de la raíz (*Fusarium solani*) (Rojo *et al.*, 2007; Erazo *et al.*, 2021) y carbón del maní (*Thecaphora frezii*) (Ganuza *et al.*, 2018), pero a diferencia de la viruela, ambas son enfermedades del rizoplano. Por otro lado, Hasan *et al.* (2014) reportaron una menor intensidad puntualmente de viruela, mediante la aplicación foliar de un bioformulado comercial a base de *Trichoderma*, en concordancia con Mortigliengo *et al.* (2020), cuyo nivel de intensidad fue similar al del testigo químico (clorotalonil). Respecto a *Pseudomonas*, Kishore *et al.* (2005d), encontraron una disminución de la severidad de viruela al aplicar también de manera foliar, *P. aeruginosa* GSE 18 más clorotalonil, respecto al fungicida solo. Zhang *et al.* (2001), sin embargo, no encontraron un control de la enfermedad al aplicar un grupo de PGPR y de elicitors a las hojas.

La producción de maní en vainas, granos totales y granos tamaño confitería fue mas alta los tres años de ensayos en los lotes cercanos a Vicuña Mackenna, debido entre otras causas al menor historial de uso de los mismos para este cultivo y las mejores condiciones edáficas (suelos mas arenosos). A su vez, esa diferencia fue mas acentuada al considerar los rendimientos en grano, debido a que en General Cabrera, la incidencia (porcentaje de vainas enfermas) de carbón del maní (*T. frezii*), fue mucho mas elevada, superior a 47% los tres años, respecto a la otra localidad donde nunca superó el 15% promedio (datos registrados a partir de las muestras con las que se estimaron los rendimientos). Siendo esta una enfermedad que también genera grandes pérdidas de rendimiento, las cuales están directamente asociadas a su incidencia (Rago *et al.*, 2017).

Durante los primeros dos años de ensayos (2017/18 y 2018/19) en ambas localidades, no se encontró una relación clara entre las suspensiones aplicadas a las semillas y/o los fungicidas foliares y el rendimiento del cultivo. Para el último año de ensayos (2019/20) tampoco hubo significancia estadística, pero para ambas localidades se pudo observar una tendencia de menor rendimiento en el testigo sin fungicidas, mas allá del bioformulado aplicado en las semillas.

La producción en General Cabrera tuvo una relación directa positiva con las precipitaciones, en cambio en Vicuña Mackenna, el primer año tuvo valores medios mas altos, pese a que fue el año mas seco, esto posiblemente se deba a una buena condición de humedad al momento de la siembra y una buena distribución de las precipitaciones a lo largo del ciclo del cultivo, mas allá de su escaséz. De todos modos, es de destacar que esta es una variable que depende de muchos factores al ser estimada, como el muestro, la compensación del cultivo, entre otros; una mejor manera de estimar dichos rendimientos, sería realizar la cosecha total de la parcela con máquina, incluso considerando parcelas mas grandes y así evitar este tipo de errores.

Analizando los curasemillas de a pares, se encontró que en los ensayos de General Cabrera 2018/19 y de Vicuña Mackenna 2019/20, la inoculación de las semillas con *T. harzianum* ITEM 3636, generó un mayor rendimiento en granos confitería que el control (sin inoculación), que no estuvo relacionado con la intensidad de viruela tardía. Esto coincide con lo reportado por Ganuza *et al.* (2018), que encontraron mayor número de granos calidad confitería y mayor peso de granos totales por planta al aplicar *T. harzianum* ITEM 3636 a las semillas de maní. Kishore *et al.* (2005d) también encontraron un mayor rendimiento en vainas al aplicar *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18. Por otro lado, Figueredo *et al.* (2017), tras la inoculación en el surco con *Bacillus* sp. CHEP5 señalaron un mayor rendimiento en los mismos tres parámetros evaluados en el presente trabajo para una localidad, mientras que en otra solo observaron un mayor rendimiento en granos confitería.

Respecto a los fungicidas foliares, no hubo incrementos en la producción, solo alguna tendencia a favor de la aplicación de cualquiera de los principios activos respecto al testigo en el último año para ambas localidades. Considerando que según su incidencia y severidad muchas plantas llegaron a tener porcentajes de pérdida de área foliar elevados, si la cosecha hubiera sido mecánica, como en lotes comerciales, los rendimientos hubieran sido mas bajos, por desprendimiento de vainas y dificultades en la inversión de las plantas, arrojando posiblemente diferencias significativas en lo que se pudo observar solamente como una tendencia. Algunos trabajos reportan incrementos de rendimiento con el uso de fungicidas, vinculados estrechamente con un control de viruela. Culbreath *et al.* (2009) reportaron que penthiopirad (carboxamida) al igual que clorotalonil permitieron un mayor rendimiento que el testigo tras un buen manejo de viruela. Otro trabajo destaca el comportamiento de prothioconazole respecto al resto de los triazoles, que al igual que clorotalonil, lograron mayores rendimientos de maní (Culbreath *et al.*, 2018). A nivel local,

Oddino *et al.* (2018), encontraron un mayor rendimiento del cultivo con los tres fungicidas o mezclas utilizadas en el presente trabajo, frente al testigo y a otros principios activos, entre ellos difenoconazole (triazol).

Al analizar las diferentes combinaciones de curasemillas y fungicidas (tratamientos), no se encontró una interacción entre los mismos, que permitiera seleccionar claramente un mejor o peor tratamiento frente a la viruela tardía del maní, y su vínculo con el rendimiento del cultivo. Sin embargo, se pudo determinar, que la aplicación foliar de fungicidas químicos, permitió una menor intensidad de la enfermedad en todos los ensayos ejecutados, respecto al testigo, encontrando que la aplicación de clorotalonil y la mezcla de triazol + estrobilurina + carboxamida, aplicados en la dosis recomendada y con el menor intervalo de tiempo (que respeta su período de residualidad), fueron los que mejor se posicionaron respecto al control de la enfermedad. La aplicación de *T. harzianum* ITEM 3636 a las semillas, logró un mayor rendimiento en granos confitería en un ensayo de cada localidad, lo que podría estar demostrando una posible promoción del rendimiento del cultivo, pese a que no estuvo asociada a una menor intensidad de la enfermedad.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

El acondicionamiento de las semillas de maní con fungicidas químicos y posterior incorporación de carboximetilcelulosa (CMC) e inoculación con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 y/o *Pseudomonas putida* RC-93, representa una manera práctica de incorporar estos microorganismos en el cultivo, sin generar perjuicios en los procesos de germinación y emergencia. A su vez, el recuento de unidades formadoras de colonias a partir de semillas inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, al igual que su observación bajo microscopía electrónica de barrido laser, permitieron determinar que dicha cepa no es afectada por los fungicidas curasemillas empleados, y que la CMC funciona correctamente como adherente.

A través de los ensayos llevados a cabo en invernadero, se encontró que al inocular las semillas con *P. putida* RC-93, se logró un mayor volumen y peso de raíces, medido en R2 – R3, lo que podría ser favorable para el cultivo, por ejemplo ante condiciones de déficit hídrico. No obstante, no se evidenció un aumento en el rendimiento en vainas o granos tras la aplicación de estas cepas. Por otro lado, la intensidad de viruela tardía (*Nothopassalora personata*) fue menor en todos los tratamientos biológicos respecto al control, encontrando un menor número de folíolos enfermos, incidencia y severidad de la enfermedad con la aplicación de *T. harzianum* ITEM 3636 solo o en coinóculo con *P. putida* RC-93 en las semillas, al igual que mediante la aplicación de *P. putida* RC-93 por riego y foliar. Estos últimos resultados, estarían indicando una potencial actividad de biocontrol de estos agentes frente a la enfermedad.

A partir de muestras de folíolos tomadas de los ensayos de invernadero, se midió la actividad enzimática de proteínas relacionadas con la patogénesis (β -1,3-glucanasa y quitinasa) y una enzima de defensa (polifenol oxidasa), como posibles indicadores de una inducción de resistencia sistémica en las plantas. Sin embargo, no se encontró que la aplicación de los bioformulados de *T. harzianum* ITEM 3636 en semilla, o *P. putida* RC-93 de manera foliar o por riego, hubieran generado un aumento en dicha actividad; de todos modos, podrían evaluarse otros compuestos involucrados en diferentes rutas metabólicas que forman parte de las respuestas de defensa en la planta, incluyendo más momentos de muestreo y variando las técnicas para su cuantificación.

Mediante la tinción de tejidos radicales, y su posterior observación bajo microscopía confocal de barrido láser, se pudo confirmar que *T. harzianum* ITEM 3636 se comporta como endófito en las raíces de maní, una vez que es inoculado en las semillas. Esto le permitiría al hongo, estar más protegido de las condiciones ambientales y frente a otros microorganismos, y mantener posiblemente, una relación más estrecha y de mayor duración con la planta.

En los ensayos realizados a campo, se incluyeron lotes agrícolas de zonas muy diferentes respecto a su historial de uso para el cultivo de maní (General Cabrera, con mayor historia del cultivo, y Vicuña Mackenna) en tres campañas agrícolas sucesivas 2017/18, 2018/19, 2019/20. En el primer año no se presentaron las condiciones para el desarrollo de viruela tardía, pero en los siguientes dos años, donde sí se presentó la enfermedad, la combinación de los bioformulados inoculados en las semillas y fungicidas químicos foliares, no generó diferencias en la intensidad de la enfermedad. La intensidad fue dependiente del factor fungicidas, donde el control arrojó los valores más altos de incidencia, severidad, tasa de incremento y ABCPE. A su vez, se pudo observar que los fungicidas clorotalonil en cinco aplicaciones y fluxapyroxad + epoxiconazole + pyraclostrobin en cuatro aplicaciones, fueron los que mejor se posicionaron (sin diferencias estadísticamente significativas) frente al control de la enfermedad, principalmente en la localidad de General Cabrera, donde la presión de la enfermedad fue mucho más alta. Al evaluar los rendimientos en estos mismos ensayos, no hubo diferencias para ninguno de los factores evaluados, aunque se registraron valores más bajos en los controles sin fungicida de ambos campos en la última campaña, posiblemente ligado al efecto de la intensidad de la viruela tardía, y que de no haber sido manual su cosecha, estas diferencias podrían haber sido significativas. A su vez, se encontró que en dos de los ensayos, la inoculación con *T. harzianum* ITEM 3636 generó un mayor rendimiento en granos calidad confitería, respecto al control sin inocular, lo que estaría señalando una posible promoción del rendimiento del cultivo.

En el escenario mundial actual, el manejo integrado de enfermedades representa una estrategia muy importante y que debe ser tenida en cuenta en todos los sistemas productivos, principalmente en aquellos como en el cultivo de maní, altamente dependiente de fungicidas de síntesis química y con una demanda mundial cada vez más exigente. La utilización de microorganismos como ACB de enfermedades, es una de las herramientas más estudiadas y con mayor potencial, sin embargo, su estudio lleva mucho tiempo y demanda gran cantidad de esfuerzos para comprobar si dichos microorganismos

pueden ser utilizados con tal fin, y encontrar la manera más adecuada y práctica de aplicarlos. La inoculación a las semillas de maní con *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 y *Pseudomonas putida* RC-93, es una herramienta que tiene potencial para el manejo integrado de la viruela tardía (*Nothopassalora personata*), como se ha demostrado frente a otras enfermedades; los estudios deben continuar, para encontrar la forma de aplicación que permita los mejores resultados, y poder dulcificar cuales son los mecanismos involucrados en el biocontrol.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, T., Argueso, C.T. (2016). Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Annals of Botany*: 119 (5): 725-735. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw211>
- Anand, T., Chandrasekaran, A., Kuttalam, S., Raguchander, T., Prakasam, V., Samiyappan, R. (2007). Association of some plant defense enzyme activities with systemic resistance to early leaf blight and leaf spot induced in tomato plants by azoxystrobin and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Plant Interactions*: 2 (4): 233-244. <https://doi.org/10.1080/17429140701708985>
- Anand, S., Jayarama, R. (2009). Biocontrol potential of *Trichoderma* sp. against plant pathogens. *International Journal of Agriculture Science*: 1 (2): 30-39.
- Anco, D. (2018). Peanut disease management. En: Marshal, M. (Ed.) *South Carolina pest management handbook for field crops*. (pp 195-205): Universidad Clemson, Carolina del Sur, Estados Unidos.
- Anco, D.J., Thomas, J.S., Jordan, D.L., Shew, B.B., Monfort, W.S., Mehl, H.L., Small, I.M., Wright, D.L., Tillman, B.L., Dufault, N.S., Hagan, A.K., Campbell, H.L. (2020a). Peanut yield loss in the presence of defoliation caused by late or early leaf spot. *Plant Disease*: 104 (5): 1390-1399. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2286-RE>
- Anco, D.J., Thomas, J.S., Wright, D.L., Dufault, N.S., Small, I.M. (2020b). Sixty-one years following registration, phorate applied in-furrow at planting suppresses development of late leaf spot on peanut. *Plant Disease*: 104: 2885-2890. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0547-RE>
- Andrés, J.A., Pastor, N.A., Ganuza, M., Rovera, M., Reynoso, M.M., Torres, A. (2016). Biopesticides: An ecofriendly approach for the control of soil-borne pathogens in peanut. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*: 161-179. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_9
- Anil, K., Podile, A.R. (2012). HarpinPss-mediated enhancement in growth and biological control of late leaf spot in groundnut by a chlorothalonil-tolerant *Bacillus thuringiensis* SFC24. *Microbiological Research*: 167 (4): 194-198. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.07.002>
- Anzuay, M.A., Ruiz Ciancio, M.G., Ludueña, L.M., Angelini, J.G., Barros, G., Pastor, N., Taurian, T. (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research*: 199: 98-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.006>
- Ardila, H., Higuera, B.L. (2005). Inducción diferencial de polifenoloxidasas y β -1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta Biológica Colombiana*: 10 (2): 61-74.
- Arya, S.S., Salve, A.R., Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: a review. *Journal of food science and technology*: 53 (1): 31-41. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9>
- Backman, P.A., Crawford, M.A. (1984). Relationship between yield loss and severity of early and late leafspot diseases of peanuts. *Phytopathology*: 74: 1101-1103. <https://doi.org/10.1094/Phyto-74-1101>
- Bagnall, D.J., King, R.W. (1991). Response of peanut (*Arachis hypogaea*) to temperature, photoperiod and irradiance 1. Effect on flowering. *Field Crops Research*: 26 (3-4): 263-277. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(91\)90004-F](https://doi.org/10.1016/0378-4290(91)90004-F)

- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., vanLoon, L.C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*: 97 (2): 239-243. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0239>
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., Sakthivel, N. (2012). Plant b-1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*: 34: 1983-1990. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1012-6>
- Baldessari, J.J. (2017). Mejoramiento Genético. En: Fernandez, E.M., Giayetto, O. (Eds.), *El cultivo del maní en Córdoba*. (pp. 41-54). Río Cuarto, Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN 978-987-42-3736-1.
- Barakat, I., Chtaina, N., Grappin, P., El Guilli, M., Ezzahiri, B., Aligon, S., Neveu, M., Marchi, M. (2019). "Induced Systemic Resistance (ISR) in *Arabidopsis thaliana* by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* Used as Seed Treatments" *Agriculture*: 9 (8): 166. <https://doi.org/10.3390/agriculture9080166>
- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quadt-Hallman, A., Tuzu, S. (1996). Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*: 112 (3): 919-929. <https://doi.org/10.1104/pp.112.3.919>
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C. (2004). Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*: 7 (4): 249-260.
- Bianco, C.A., Kraus, T.A., Nuñez, C.O. (2006). *Botánica Agrícola* (2da ed). Río Cuarto, Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN 978-950-665-400-9.
- Bishi, S.K., Kumar, L., Mahatma, M.K., Khatediya, N., Chauhan, S.M., Misra, J.B. (2015). Quality traits of Indian peanut cultivars and their utility as nutritional and functional food. *Food Chemistry*: 167: 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.076>
- Boller, T., Mauch, F. (1988). Colorimetric assay for chitinase. *Methods in Enzymology*: 161: 430-435.
- Boote, K.J. (1982). Growth Stages of Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut science*: 9 (1): 35-40. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-9-1-11>
- Bourgeois, G., Boote, K.J. (1992). Leaflet and canopy photosynthesis of peanut affected by late leaf spot. *Agronomy journal*: 84 (3): 359-366. <https://doi.org/10.2134/agronj1992.00021962008400030002x>
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A.R., Chet, I., Viterbo, A., Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*: 9 (3): e1003221. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003221>
- CAM. 2021. Cámara Argentina del Maní. Recuperado el 23 de diciembre de 2021. En <https://camaradelmani.org.ar/cluster-manisero/>
- Calzada, J., Rozadilla, B. (2018). *Argentina líder en exportaciones del complejo de Maní*. Informativo Semanal de la Bolsa de Comercio de Rosario. Recuperado el 16 de diciembre de 2021. En <https://bcr.com.ar/es/print/pdf/node/72852>
- Cappiello, F., March, G., Marinelli, A., García, J., Tarditi, L., D'Eramo, L., Ferrari, S., Rago, A., Oddino, C. (2012). Producción de maní según intensidad de viruela (*Cercosporidium personatum*). En March, G. (Ed.), *Ciencia y Tecnología de los cultivos industriales. Maní*. (pp. 281- 287). Córdoba, Argentina: INTA-CIAP. ISSN 1853-7677.

- Carrero-Carrón, I., Trapero-Casas, J.L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., Jiménez-Díaz, R.M. (2016). *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Protection*: 88: 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.05.009>
- Carrillo, P., Woo, S.L., Comité, E., El-Nakhel, C., Roupael, Y., Fusco, G.M., Assunta Borzacchiello, A., Lanzuise, S., Vinale, F. (2020). Application of *Trichoderma harzianum*, 6-pentyl-pyrone and plant biopolymer formulations modulate plant metabolism and fruit quality of plum tomatoes. *Plants*: 9 (6): 771. <https://doi.org/10.3390/plants9060771>
- Carro-Huerga, G., Compant, S., Gorfer, M., Cardoza, R.E., Schmoll, M., Gutiérrez, S., Casquero, P.A. (2020). Colonization of *Vitis vinifera* L. by the endophyte *Trichoderma* sp. strain T154: biocontrol activity against *Phaeoacremonium minimum*. *Frontiers in Plant Science*: 11: 1170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01170>
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and environmental microbiology*: 65 (3): 929-935. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.929-935.1999>
- CASAFE. (2021). Cámara de Seguridad Agropecuaria y Fertilizantes. *Guía Online de Productos Fitosanitarios*. Recuperado el 20 de noviembre de 2021. En <https://guiaonline.casafe.org>
- Catalano, V., Vergara, M., Hauzenberger, J.R., Seiboth, B., Sarrocco, S., Vannacci, G., Kubicek, C.P., Seidl-Seiboth, V. (2011). Use of a nonhomologous end-joiningdeficient strain (delta-ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. *Current Genetics*: 57 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0322-2>
- Chacón, M.R., Rodríguez Galán, O., Benítez Fernández, C.T., Sousa, S., Rey, M., Llobell González, A., Delgado Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*: 10: 19-27.
- Chen, C., Bélanger, R.R., Benhamou, N., Paulitz, T. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiology and Molecular Plant Pathology*: 56 (1): 13-23. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0243>
- Comisión Europea. (2019). Commission implementing regulation (EU) 2019/677. Official Journal of European Union. Recuperado el 2 de abril de 2022. En: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/677/oj.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A. (2005). Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*: 71 (9): 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*: 16 (10): 524-531. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Pena, E., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*: 6 (10): 1554-1563. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17443>
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., Moëgne-Loccoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol

- agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*: 48 (5): 505–512. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x>
- Culbreath, A.K., Brenneman, T.B., Kemerait, R.C., Hammes, G.G. (2009). Effect of the new pyrazole carboxamide fungicide penthiopyrad on late leaf spot and stem rot of peanut. *Pest Management Science*: 65 (1): 66–73. <https://doi.org/10.1002/ps.1646>
- Culbreath, A.K., Brenneman, T.B., Kemerait, R.C., Stevenson, K.L. (2016). Changes in the efficacy of pyraclostrobin for control of peanut leaf spot diseases. En Leon, R., Cutchins, K. (Eds.), *48th Proceedings of the American Peanut Research and Education Society, Annual Meeting*. (pp 67). Clearwater Beach, Florida, Estados Unidos: American Peanut Research and Education Society, Inc.
- Culbreath, A.K., Brenneman, T.B., Kemerait, R.C., Stevenson, K.L., Anco, D.J. (2019). Combinations of elemental sulfur with demethylation inhibitor fungicides for management of late leaf spot (*Nothopassalora personata*) of peanut. *Crop Protection*: 125: 104911. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104911>
- Culbreath, A.K., Brenneman, T.B., Kemerait, R.C., Stevenson, K.L., Henn, A. (2020). Effect of DMI and QoI fungicides mixed with the SDHI fungicide penthiopyrad on late leaf spot of peanut. *Crop Protection*: 137: 105298. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105298>
- Culbreath, A.K., Gevens, A.J., Stevenson, K.L. (2018). Relative effects of demethylation-inhibiting fungicides on late leaf spot of peanut. *Plant Health Progress*: 19 (1): 23-26. <https://doi.org/10.1094/PHP-09-17-0053-RS>
- Cutler, H.G., Himmelsbach, D.S., Arrendale, R.F., Cole, P. D., Cox, R.H. (1989). Koningin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. *Agricultural and Biological Chemistry*: 53 (10): 2605-2611. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869746>
- Danay, I., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*: 24 (1): 14-21. ISSN 2224-4697.
- da Silva, C.R., Koblitz, M.G.B. (2010). Partial characterization and inactivation of peroxidases and polyphenol-oxidases of umbu-cajá (*Spondias* spp.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*: 30 (3): 790-796.
- De La Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Bajsa, N., Quagliotto, L. (2004). *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology*: 110 (7): 671-681. <https://doi.org/10.1023/b:ejpp.0000041569.35143.22>
- Dilley, O.D.F., Broetto, L., Rissato, B.B., Gonçalves-Trevisoli, E.D.V., Coltro-Roncato, S., Dal'Maso, E.G., Meinerz, C.C., Henkemeier, N.P., Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J., Webler, T.F.B. (2016). *Trichoderma*-bean interaction: defense enzymes activity and endophytism. *African Journal of Agricultural Research*: 11 (43): 4286-4292. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11687>
- Dillehay, T.D., Rossen, J., Andres, T.C., Williams, D.E. (2007). Pre-ceramic adoption of peanut, squash, and cotton in northern Peru. *Science*: 316 (5833): 1890-1893. <https://doi.org/10.1126/science.1141395>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2017). *InfoStat Versión 2011*. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Djonović, S., Pozo, M.J., Kenerley, C.M. (2006). Tv-bgn3, a beta-1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens* is involved in mycoparasitism and control of

- Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*: 72 (12): 7661-7670. <https://doi.org/10.1128/aem.01607-06>
- Djonović, S., Vittone, G., Mendoza-Herrera, A., Kenerley, C.M. (2007). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing beta-1,3- and beta-1,6- glucanase genes. *Molecular Plant Pathology*: 8 (4): 469-480. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00407.x>
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*: 9 (10): 749-759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Durman, S., Menéndez, A., Godeas, A. (2003). Evaluación de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* “in vitro” y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología*: 31 (1): 13-18.
- El-Katatny, M.H., Idres, M.M. (2014). Effects of single and combined inoculations with *Azospirillum brasilense* and *Trichoderma harzianum* on seedling growth or yield parameters of wheat (*Triticum vulgare* L., Giza 168) and corn (*Zea mays* L., Hybrid 310). *Journal of Plant Nutrition*: 37 (12): 1913-1936. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.911322>
- El Komy, M.H., Saleh, A.A., Eranthodi, A., Molan, Y.Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *Plant Pathology Journal*: 31 (1): 50-60. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087>
- Erazo J. (2020). *Efecto de la inoculación de maní (Arachis hypogaea L.) con Trichoderma harzianum ITEM 3636. Su potencial empleo como inoculante microbiano para el control de la podredumbre parda de la raíz*. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Erazo, J.G., Palacios, S.A., Pastor, N., Giordano, F.D., Rovera, M., Reynoso, M.M., Venisse, J.S., Torres, A.M. (2021). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* RC 386. *Biological Control*: 164. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104774>
- Etesami, H., Maheshwari, D.K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 156: 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Figueredo, M.S., Tonelli, M.L., Ibáñez, F., Morla, F., Cerioni, G., Tordable, M del C., Fabra, A. (2017). Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. *Microbiological Research*: 197: 65-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.002>
- Francisco, M.L.D.L., Resurrección A.V.A. (2008). Functional components in peanuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 48 (8): 715-746. <https://doi.org/10.1080/10408390701640718>
- Fulmer, A.M. (2017). *Differentiation, prediction and management of early and late leaf spot of peanut in the southeastern United States and Haiti*. Tesis de Doctorado en Filosofía, Universidad de Georgia, Athens, Estados Unidos.
- Ganuza, M., Pastor, N., Boccolini, M., Erazo, J., Palacios, S., Oddino, C., Reynoso, M.M., Rovera, M., Torres, A.M. (2019). Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma*

- harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils. *Journal of Applied Microbiology*: 126 (2): 608-623. <https://doi.org/10.1111/jam.14147>
- Ganuza, M., Pastor, N., Erazo, J., Andrés, J., Reynoso, M.M., Rovera, M., Torres, A.M. (2018). Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut smut, an emergent disease caused by *Thecaphora frezii*. *European Journal of Plant Pathology*: 151:257–262. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1360-0>
- Gajera, H.P., Savaliya, D.D., Patel, S.V., Golakiya, B.A. (2015). *Trichoderma viride* induces pathogenesis related defense response against rot pathogen infection in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Infection, Genetics and Evolution*: 34: 314-325. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.003>
- García, G. (2005). *Perfil descriptivo de la cadena de Maní*. Rescatado el 28 de julio de 2021. En: <https://www.magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/publicaciones/perspectivas/Perfiles%20descriptivos/Cadena%20de%20man%C3%AD.pdf>
- Giayetto, O. (2017). Origen, historia y clasificación. En: Fernandez, E.M., Giayetto, O. (Eds.), *El cultivo del maní en Córdoba*. (pp. 27-38). Río Cuarto, Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN 978-987-42-3736-1.
- Giayetto, O., Fernandez, E.M., Cerioni, G.A., Morla, F.D. (2017). Crecimiento. En Fernandez, E.M., Giayetto, O. (Eds.), *El Cultivo de Maní en Córdoba*, (2da ed). (pp. 67- 96). Río Cuarto, Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto. ISBN 978-987-42-3736-1.
- Giordano, D.F., Conforto, E.C., Paredes, J., Monguillot, J., Bernardi Lima, N., Rago, A., Oddino, C. (2021b). Efecto de fungicidas multisitio en el control de viruela del maní (*Nothopassalora personata*). En Galdeano, E., et al. (Eds.), *Libro de resúmenes 5º Congreso Argentino de Fitopatología. 59 th Meeting of the aps caribbean división*. (pp 360). Córdoba, Argentina: Asociación Civil Argentina de Fitopatólogos. ISBN 978-987-24373-3-6
- Giordano, D.F., Pastor, N., Palacios, S., Oddino, C.M., Torres, A.M. (2021a). Peanut leaf spot caused by *Nothopassalora personata*. *Tropical Plant Pathology*: 46 (2): 139-151. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00411-3>
- Gremillion, S., Culbreath, A., Gorbet, D., Mullinix, B.Jr., Pittman, R., Stevenson, K., Todd, J., Condori, M. (2011). Response of progeny bred from bolivian and north American cultivars in integrated management systems for leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*). *Crop Protection*: 30 (6): 698-704. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.012>
- Gupta, V., Kumar, G.N., Buch, A. (2020). Colonization by multi-potential *Pseudomonas aeruginosa* P4 stimulates peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth, defence physiology and root system functioning to benefit the root-rhizobacterial interface. *Journal of Plant Physiology*: 248: 153144. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153144>
- Gupta, P., Ravi, I., Sharma, V. (2013). Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Journal of Plant Interactions*: 8 (2): 155-161. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>
- Haas, D., Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonized *Pseudomonas* spp., and relevance for biological control of plant disease. *Annual Reviews of Phytopathology*: 41 (1): 117-153. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>
- Haas, D., Défago, D. (2005). Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*: 3 (4): 307-319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>

- Hamid, B., Mohiddin, F.A. (2018). *Trichoderma* as a potential biocontrol agent. *International Journal of Advance Research in Science and Engineering*: 7 (3): 68-76. ISSN: 2319-8354.
- Hammons, R.O., Herman, D., Stalker, H.T. (2016). Origin and early history of the peanut. En Stalker, H.T., Wilson, R.F. (Eds.), *Peanuts: genetics, processing, and utilization*. (pp 1-26). Londres, UK: Academic Press and AOCS Press.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* sp. opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*: 2 (1): 43-56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harman, G., Khadka, R., Doni, F., Uphoff, N. (2021). Benefits to plant health and productivity from enhancing plant microbial symbionts. *Frontiers in Plant Science*: 11:610065. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610065>
- Harman, G.E., Shores, M. (2007). The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. En Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* (pp. 131-53). Amsterdam, The Netherlands: Springer.
- Harman, G.E., Uphoff, N. (2019). Advantages and methods of using symbiotic microbes to enhance plant agriculture and the environment. *Scientifica*: 8: 1-25. <https://doi.org/10.1155/2019/9106395>
- Haro, R.J., Baldessari, J., Otegui, M.E. (2013). Genetic improvement of peanut in Argentina between 1948 and 2004: Seed yield and its components. *Field Crops Research*: 149: 76-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2013.04.021>
- Hasan, M., Islam, R., Hossain, I., Shirin, K. (2014). Biological control of leaf spot of groundnut. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*: 1 (2): 66-78. <https://doi.org/10.18801/jbar.010214.08>
- Hermosa, R., Rubio, M.B., Cardoza, R.E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*: 16 (2): 69-80. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.181>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*: 158 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M.C., Macías-Rodríguez, L.I., la Cruz, H.R., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*: 81: 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Higgs, J. (2003). The beneficial role of peanuts in the diet – Part 2. *Nutritional & Food Science*: 33 (2): 56-64. <https://doi.org/10.1108/00346650310466637>
- Hjeljord, L., Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En Harman, G.E., Kubice, C.P. (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*, Volumen 2. (pp. 131-151). Bristol, Londres: Taylor & Francis. ISBN: 0- 7484-0805-3.
- Hohmann, P., Jones, E.E., Hill, R.A., Stewart, A. (2012). Ecological studies of the bio-inoculant *Trichoderma hamatum* LU592 in the root system of *Pinus radiata*. *FEMS Microbiology Ecology*: 80 (3): 709 - 721. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01340.x>
- Ijaz, M., Ali, A.R., Afzal, A. (2019). Impact of crop rotation on *Cercospora* leaf spot of peanut. *Plant Protection*: 3 (1): 41-45. <https://doi.org/10.33804/pp.003.01.0111>

- Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Hamayun, M., Jan, F.G., Iqbal, A. (2019). Novel antimicrobial and antioxidative activity by endophytic *Penicillium roqueforti* and *Trichoderma reesei* isolated from *Solanum surattense*. *Acta Physiologiae Plantarum*: 41: 164. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2957-z>
- Inch, S., Gilbert, J. (2011). Scanning electron microscopy observations of the interaction between *Trichoderma harzianum* and perithecia of *Gibberella zeae*. *Mycologia*: 103 (1): 1-9. <https://doi.org/10.3852/09-285>
- Jetiyanon, K., Kloepper, J. (2002). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*: 24 (3): 285-291. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00022-1)
- Jordan, B.S., Culbreath, A.K., Brenneman, T.B., Kemerait, R.C., Branch, W.D. (2017). Late leaf spot severity and yield of new peanut breeding lines and cultivars grown without fungicides. *Plant Disease*: 101 (11): 1843-1850. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0165-RE>
- Jordan, B.S., Culbreath, A.K., Brenneman, T.B., Kemerait, R.C.Jr., Stevenson, K.L. (2019). Effect of planting date and peanut cultivar on epidemics of late leaf spot in Georgia. *Plant Disease*: 103 (5): 990-995. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0954-RE>
- Junjittakarn, J., Girdthai, T., Jogloy, S., Vorasoot, N., Patanothai, A. (2014). Response of root characteristics and yield in peanut under terminal drought condition. *Chilean journal of agricultural research*: 74 (3): 249-256. <https://dx.doi.org/10.4067/S07185839201400030001>
- Karthikeyan, M., Jayakumar, V., Radhika, K., Bhaskaran, R., Velazhahan, R., Alice, D. (2005). Induction of resistance in host against the infection of leaf blight pathogen (*Alternaria palandui*) in onion (*Allium cepa* var *aggregatum*). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*: 42 (6): 371-377.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*: 44: 301-307.
- Kishore, K., Pande, S., Narayana Rao, J., Podile, A.R. (2005c). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the plant cell wall degrading enzymes of *Sclerotium rolfsii* and reduces the severity of groundnut stem rot. *European Journal of Plant Pathology*: 113: 315-320. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0295-z>
- Kishore, K.G., Pande, S., Podile, A.R. (2005a). Biological Control of Late Leaf Spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology*: 95 (10): 1157-1165. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157>
- Kishore, G.K., Pande, S., Podile, A.R. (2005b). Chitin-supplemented foliar application of *Serratia marcescens* GPS 5 improves control of late leaf spot disease of groundnut by activating defence-related enzymes. *Journal of Phytopathology*: 153 (3): 169-73. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00951.x>
- Kishore, K.G., Pande, S., Podile, A.R. (2005d). Management of late leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea*) with chlorothalonil-tolerant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Plant Pathology*: 54 (3): 401-408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01160.x>
- Köhl, J., Booij, K., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J. (2019). Ecological arguments to reconsider data requirements regarding the environmental fate of microbial biocontrol agents in the registration procedure in the European Union. *BioControl*: 64 (5): 469-448. <https://doi.org/10.1007/s10526-019-09964-y>
- Kolte, S.J. (1985). *Diseases of Annual Edible Oilseeds Crops. Vol I. Groundnut.* (pp 155). Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press. ISBN 97813158923 51.

- Konappa, N., Dhamodaran, N., Shanbhag, S.S., Sampangi, M.A., Krishnamurthy, S., Arakere, U.C., Chowdappa, S., Jogaiah, S. (2022). *Trichoderma*: a potential biopesticide for sustainable management of wilt disease of crops. En Rakshit, A., Meena, V.S., Abhilash, P.C., et al. (Eds). *Biopesticides. Volumen 2: Advances in Bio-Inoculants*. (pp. 261-275). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00003-1>
- Kondoh, M., Hirai, M., Shoda, M. (2001). Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 91 (2): 173-177. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80061-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80061-X)
- Krapovickas, A., Gregory, W.C. (1994). Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*: 8: 1-186.
- Lamb, M.C., Sorensen, R.B., Butts, C.L., Dang, P.M., Chen, C.Y., Arias, R.S. (2017). Chemical Interruption of Late Season Flowering to Improve Harvested Peanut Maturity. *Peanut Science*: 44 (1): 60-65. <https://doi.org/10.3146/PS16-2.1>
- Larran, S., Santamarina Siurana, M.P., Roselló Caselles, J., Simón, M.R., Perelló, A. (2020). *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium sudanense* causing seedling blight and seed rot on wheat. *ACS Omega*: 5 (36): 23276-23283. <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c03090>
- Latz, M.A., Jensen, B., Collinge, D.B., Jørgensen, H.J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*: 11 (5-6): 555-567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
- Lopes, R.M., Costa, T.S.A., Gimenes, M.A., Silveira, D. (2011). Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 59 (9): 4321–4330. <https://doi.org/10.1021/jf104663>.
- Madhaiyan, M., Reddy, B.V.S., Anandham, R., Senthilkumar, M., Poonguzhali, S., Sundaram, S.P., TongMin, S.A. (2006). Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Current Microbiology*: 53 (4): 270–276. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0452-9>
- MAGyP. (2021). Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. *Estimaciones agrícolas*. Recuperado el 20 de octubre de 2021. En: <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- Maier, E.H., Bardella, E.J., García, J., Oddino, C., Pérez Agostini, M.A., Avanzini, G. (2017). Nuevas alternativas de fungicidas curasemillas en maní – ensayos de selectividad y eficacia en condiciones de laboratorio y a campo (campana 2016-2017). *Actas de Resúmenes XXXII Jornada Nacional del Maní* (pp. 48-50). General Cabrera, Argentina
- Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M.R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., Napolitano, M., Lombardi, N., Lorito, M., Woo, S.L. (2018). Modulation of Tomato Response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and Its Secondary Metabolite Harzianic Acid. *Frontiers in Microbiology*: 9: 1966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01966>
- Manjula, K., Kishore, K.G., Girish, A.G., Singh, S.D. (2004). Combined application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an improved biocontrol activity against stem rot in groundnut. *Plant Pathology Journal*: 20 (1): 75-80. <https://doi.org/10.5423/ppj.2004.20.1.075>
- March, G.J., Marinelli, A. (2005). Enfermedades y Sistema Productivo. En: March, G.J., Marinelli, A. (Eds.), *Enfermedades del maní en Argentina*. (pp. 1-11). Córdoba, Argentina: Biglia Impresores. ISBN: 987-43-8755-6.

- March, G., Oddino, C., García, J., Marinelli, A., Rago, A. (2012). Eficiencia de fungicidas en el control de la viruela del maní según presión de enfermedad. March, G. (Ed.), *Ciencia y Tecnología de los cultivos industriales. Maní*. (pp. 261-265). Córdoba, Argentina: Biglia Impresores. ISSN: 183- 7677.
- Marinelli, A., March, G.J. (2005). Viruela. En: March, G.J., Marinelli, A. (Eds.), *Enfermedades del maní en Argentina*. (pp. 13-39). Córdoba, Argentina: Biglia Impresores. ISBN: 987-43-8755-6.
- Marinelli, A.D., Oddino, C.M., March, G.J. (2017). Enfermedades fúngicas del maní. Fernandez, E., Giayetto, O. (Eds.) *El cultivo de maní en Argentina*. (2° Edición). Río Cuarto, Argentina: UNRC. ISBN: 978-987-42-3736-1.
- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S.L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Turrà, D., Fogliano, V., Scala, F., Lorito, M. (2006). Study of the three- way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens using a proteome approach. *Current Genetics*: 50 (5): 307-321. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0091-0>
- Martinez-Medina, A., Pozo, M.J., Cammue, B.P.A., Vos, C.M.F. (2016). Belowground defence strategies in plants: The plant-*Trichoderma* dialogue. En: Vos, C.M.F., Kazan, K. (Eds.) *Belowground defence strategies in plants*. (pp. 301-327). Cham, Suiza: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42319-7_13
- Mastouri, F., Björkman, T., Harman, G.E. (2010). Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings. *Phytopathology*: 100 (11): 1213-1221. <https://doi.org/10.1094/phyto-03-10-0091>
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H., Turland, N.J. (2012). International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne code) adopted by the eighteenth international botanical congress Melbourne, Australia, July 2011. *Regnum Vegetabile*: 154: 1-140.
- McSpadden Gardener, B.B. (2007). Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*: 97 (2): 221-226. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0221>
- Medeiros, H.A., Araujo Filho, J.V., Freitas, L.G., Castillo, P., Rubio, M.B., Hermosa, R., Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific Reports*: 7 (1): 40216. <https://doi.org/10.1038/srep40216>
- Meena, B., Radhajeyalakshmi, R., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P., Doraiswamy, S., Velazhahan, R. (2000). Induction of pathogenesis-related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia-lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Plant Diseases and Protection*: 107 (5): 514-527.
- Meena, B., Radhajeyalakshmi, R., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P., Velazhahan, R. (2002). Biological control of groundnut late leaf spot and rust by seed and foliar applications of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol Science and Technology*: 12 (2): 195-204. <https://doi.org/10.1080/09583150120124450>
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*: 32 (2): 62-85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>

- Meshram, S., Bisht, S., Gogoi, R. (2022). Current development, application and constraints of biopesticides in plant disease management. Rakshit A., Meena, V.S., Abhilash, P.C., *et al.* (Eds), *Biopesticides. Volumen 2: Advances in Bio-Inoculants*. (pp: 207-224). Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00004-3>
- Mayer, A.M., Harel, E., Shaul, R.B. (1966). Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. *Phytochemistry*: 5 (4): 783-789. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83660-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83660-2)
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*: 31 (3): 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mochizuki, S., Saitoh, K.I., Minami, E., Nishizawa, Y. (2011). Localization of probe-accessible chitin and characterization of genes encoding chitin-binding domains during rice–*Magnaporthe oryzae* interactions. *Journal of General Plant Pathology*: 77: 163-173. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0310-5>
- Monguillot, J.H., Paredes, J.A., Asinari, F., Giordano, F., Oddino, C., Rago, A.M., Conforto, C. (2020). Control de la viruela tardía del maní utilizando ingredientes activos fungicidas individualmente. *Actas de Resúmenes XXXV Jornada Nacional del Maní* (pp. 52-53). General Cabrera, Argentina.
- Morla, F.D., Giayetto, O., Cerioni, G.A., Fernandez, E.M. (2017). Source-sink analysis of runner type cultivars grown in Argentina. *9th International Conference of the Peanut Research Community: Advances in Arachis through Genomics & Biotechnology*. Córdoba, Argentina
- Morrison, C.K., Arseneault, T., Novinscak, A., Filion, M. (2017). Phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* LBUM636 alters *Phytophthora infestans* growth and late blight development. *Phytopathology*: 107 (3): 273–279. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-16-0247-r>
- Mortigliengo, S., Giordano, F., Giraudo, R., Oddino, C. (2020). Efecto del control biológico sobre la intensidad de viruela y arañuela del maní. *Actas de Resúmenes XXXV Jornada Nacional del Maní* (pp. 54-55). General Cabrera, Argentina.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C.M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*: 51 (1): 105-129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Nawrocka, J., Gromek, A., Małolepsza, U. (2019). Nitric oxide as a beneficial signaling molecule in *Trichoderma atroviride* TRS25-induced systemic defense responses of cucumber plants against *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Plant Science*: 10: 421. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00421>
- Nogueira-Lopez, G., Greenwood, D.R., Middleditch, M., Winefield, C., Eaton, C., Steyaert, J.M., Mendoza-Mendoza, A. (2018). The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defense and scavenging oxidative stress secreted proteins. *Frontiers in Plant Science*: 9: 409. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00409>
- Nutter, F.W., Shokes, F.M. (1995). Management of foliar diseases caused by fungi. En Melouk, H.A., Shokes, F.M (Eds.), *Peanut health management* (pp. 65-73). St. Paul, Minesota: APS Press.
- O'Brien, P. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*: 46: 293-304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Oddino, C., García, J., Marinelli, A., Rago, A., March, G. (2012). Variación de la eficiencia de triazoles en el control de la viruela del maní según severidad de la enfermedad. *Actas de Resúmenes XXVII Jornada Nacional del Maní* (pp. 36-38). General Cabrera, Argentina.

- Oddino, C., Paredes, J.A., Cazón, L.I., Rago, A.M., Giordano, F., Giuggia, J. (2017). Resistencia de *Cercosporidium personatum*: nuevos estudios de la eficiencia de fungicidas de diferentes grupos químicos en poblaciones del patógeno de distintos orígenes del área manisera. *Actas de Resúmenes XXXII Jornada Nacional del Maní* (pp. 48-50). General Cabrera, Argentina.
- Oddino, C., Giordano, F., Paredes, J., Cazón, L., Giuggia, J., Rago, A. (2018). Efecto de nuevos fungicidas en el control de viruela del maní y el rendimiento del cultivo. *Ab Intus*: 1 (1): 9-17. ISSN 2618-2734.
- Ong, C.K. (1984). The influence of temperature and water deficit on the partitioning of dry matter in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Experimental Botany*: 35 (5): 746-755. <https://doi.org/10.1093/jxb/35.5.746>
- Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Current Microbiology*: 73: 346-353. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1068-y>
- Pastor, N.A., Reynoso, M.M, Tonelli, M.L., Masciarelli, O., Rosas, S.B., Rovera, M. (2010). Potential biological control *Pseudomonas* sp. pci2 against damping-off of tomato caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Plant Pathology*: 92 (3): 737-745.
- Pedelini, R. (2016). *Maní: Guía práctica para su cultivo*. (4ta ed.). Córdoba, Argentina. ISSN 1851-4081.
- Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*: 8: 822. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00822>
- Periasamy, K., Sampooram, C. (1984). The morphology and anatomy of ovule and fruit development in *Arachis hypogaea* L. *Annals of Botany*: 53 (3): 399-412. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086703>
- Pescador, L., Fernandez, F., Pozo1, M.J., Romero-Puertas, M.C., Pieterse, C.M.J., Martínez-Medina, A. (2022). Nitric oxide signalling in roots is required for MYB72- dependent systemic resistance induced by *Trichoderma* volatile compounds in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*: 73 (2): 584-595. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab294>
- Pires Ribeiro, R., Heuert, J. (2019). Controle da mancha preta do amendoim utilizando diferentes estratégias. *Anais do XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim* (115758). Jaboticabal, San Pablo: Galoá.
- Plaut, J.L., Berger, R.D. (1980). Development of *Cercosporidium personatum* in three peanut canopy layers. *Peanut Science*: 7 (1): 46-49. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-7-1-11>
- Prasad, A., Babu, S. (2017). Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*: 89 (2): 1027-1040. <http://dx.doi.org/10.1590/00013765201720160617>
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen, L.H., Thomas, J.M.G. (2003). Super-optimal temperatures are detrimental to peanut (*Arachis hypogaea* L.) reproductive processes and yield at both ambient and elevated carbon dioxide. *Global Change Biology*: 9 (12): 1775-1787. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00708.x>
- Prasad, P.V.V., Craufurd, P.Q., Summerfield, R.J., Wheeler, T.R. (2000). Effects of short episodes of heat stress on flower production and fruitset of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Experimental Botany*: 51 (345): 777-784. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.777>

- Redkar, A., Jaeger, E., Doehlemann, G. (2018). Visualization of growth and morphology of fungal hyphae in planta using WGA-AF488 and propidium iodide co-staining. *BIO-101*: e2942. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2942>
- Rifai, M.A. (1969). *A revision of the genus Trichoderma*. Gran Bretaña: Commonwealth Mycological Institute.
- Rago, A., Cazón, I., Paredes, J., Edwards Molina, J., Bisonard, M., Oddino, C. (2017). Peanut Smut: From an emerging disease to an actual threat to Argentine peanut production. *Plant Disease*: 101 (3): 400-408. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1248-FE>.
- Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulze, S.N., Torres, A.M. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*: 26 (4): 549-555. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.006>
- Romero, N. (1997). Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. Morón, C., Zacarías, I., de Pablo, S. (Eds), *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. (Cap. 15). Dirección de alimentación y nutrición oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Universidad de Chile, Santiago.
- Ruano-Rosa, D., Prieto, P., Rincón, A.M., Gómez-Rodríguez, M.V., Valderrama, R., Barroso, J.B., Mercado-Blanco, J. (2016). Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *BioControl*: 61: 269-282. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9706-z>
- Saraihom, S. (2016). *Characterization of endoglucanase and genome analysis of Lysobacter enzymogenes isolated from tropical soil*. Tesis de doctorado en Filosofía, Universidad de Chulalongkorn, Bangkok, Tailandia.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods*: 9 (7): 676-682. PMID 22743772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Shaxson, F., Barber, R. (2005). Optimización de la humedad del suelo para la producción vegetal. El significado de la porosidad del suelo. Boletín de suelos de la FAO 79. Roma. ISSN 1020-0657.
- Shokes, F.M., Berger, R.D., Smith, D.H., Rasp, J.M. (1987). Reliability of disease assessment procedures: a case study with late leafspot of peanut. *Oléagineux*: 42 (6): 245-251.
- Shoresh, M., Harman, G.E., Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*: 48 (1): 21-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
- Shukla, Y.M., Suthar, K.P. (2018). Alteration in β -1,3 glucanase and chitinase activity in chickpea varieties infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 4. *Legume Research*: 41 (3): 454-460. DOI: 10.18805/lr.v40i04.9012
- Singh, A., Mehta, S., Singh, H.B., Nautiyal, C.S. (2003). Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBR I-N6 and *P. fluorescens* NBRI-N. *Current Microbiology*: 47 (2): 153-158. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3938-8>
- Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B.C., Tewari, A.K., Kumar, J. (2018). Review on Plant-*Trichoderma*- Pathogen Interaction. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*: 7 (2): 2382-2397. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.291>

- Siqueira de Azevedo, L. (2007). *Fungicidas sistémicos, Teoría e Practica*. (1er ed.) Campinas, Brasil: EMOPI.
- Smith, B.W. (1950). *Arachis hypogaea*. Aerial flower and subterranean fruit. *American Journal of Botany*: 37 (10): 802-815. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1950.tb11073.x>
- Soave, J.H., Bianco, C.A., Kraus, T.A. (2004). Descripción de dos nuevos cultivares de maní (*Arachis hypogaea* L. subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*). *AgriScientia*: 21 (2): 85-88.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larriganaga, L., Coronado, M.F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía*: 16: 509-516.
- Stevenson, K.L., Culbreath, A.K. (2006). Evidence for reduced sensitivity to tebuconazole in leaf spot pathogens. En: Sholar, J.R. (Ed.), *38th Proceedings of the American Peanut Research and Education Society, Annual Meeting* (pp 52). Savannah, Georgia, Estados Unidos: American Peanut Research and Education Society, Inc.
- Subrahmanyam, P., Williams, J.H., McDonald, D., Gibbons, R.W. (1984). The influence of foliar diseases and their control by selective fungicides on a range of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of Applied Biology*: 104 (3): 467-476. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1984.tb03029.x>
- Sun, D., Zhuo, T., Hu, X., Fan, X., Zou, H. (2017). Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological Control*: 114: 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.015>
- Tariq, M., Khan, A., Asif, M., Khan, F., Ansari, T., Shariq, M., Siddiqui, M.A. (2020). Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*: 70 (6): 507-524. <https://doi.org/10.1080/09064710.2020.1784262>
- Tonelli, M.L., Furlan, A., Taurian, T., Castro, S., Fabra, A. (2011). Peanut priming induced by biocontrol agents. *Physiological and Molecular Plant Pathology*: 75 (3): 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.11.001>
- Tseng, Y-H., Rouina, H., Groten, K., Rajani, P., Furch, A.C.U., Reichelt, M., Baldwin, I.T., Nataraja, K.N., Shaanker, R.U., Oelmüller, R. (2020). An Endophytic *Trichoderma* Strain Promotes Growth of Its Hosts and Defends Against Pathogen Attack. *Frontiers in Plant Science*: 11: 573670. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.573670>
- USDA. (2021). United States Department of Agriculture. Peanut explorer. Recuperado el 10 de enero de 2022. En: <https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2221000&selyear=2021&rankby=Production>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*: 4: 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- van den Bosch, F., Pavely, N., Shaw, M., Hobbelen, P., Oliver, R. (2011). The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology*: 60 (4): 597-606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x>
- Videira, S.I.R., Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Braun, U., Barreto, R.W., de Wit, P.J.G.M., Crous, P.W. (2017). Mycosphaerellaceae – Chaos or clarity? *Studies in Mycology*: 87: 257–421. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.09.003>

- Viji, G., Uddin, W., Romaine, C.P. (2003). Suppression of gray leaf spot (blast) of perennial ryegrass turf by *Pseudomonas aeruginosa* from spent mushroom substrate. *Biological Control*: 26 (3): 233-243. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00170-6](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00170-6)
- Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*: 48 (6): 705-711. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x>
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., Varlese, R., Marra, R., Lanzuise, S., Eid, A., Woo, S.L., Lorito, M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*: 347 (2): 123-129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., Lorito, M. (2008a). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*: 72 (1-3): 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, L.S., Lorito, M. (2008b). *Trichoderma* plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*: 40: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Weller, D.M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*: 97 (2): 250–256. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-2-0250>
- Woelke, L., Bermudez, J.M., Castillo, M., Romero, E. (2014). Carboxamidas. Rotacion de principios activos en el control de la viruela del maní (*Cercospora arachidicola* y *Cercosporidium personatum*). *Actas de Resúmenes XXX Jornada Nacional del Maní* (pp. 87-88). General Cabrera, Córdoba, Argentina.
- Woo, S.L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*: 8: 71-126. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Xia, H., Li, Y.Y., Liu, Z.C., Li, Y.Q., Chen, J. (2018). Transgenic Expression of chit42 gene from *Metarhizium anisopliae* in *Trichoderma harzianum* Enhances Antagonistic Activity against *Botrytis cinerea*. *Molecular Biology*: 52 (5): 668–675. <https://doi.org/10.1134/s002689331805014x>
- Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact*: 25 (2): 139-150. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-11-0179>
- Zhang, K., Liu, Y., Luo, L., Zhang, X., Li, G., Wan, Y., Liu, F. (2021). Root traits of peanut cultivars with different drought resistant under drought stress at flowering and pegging phase. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*: 71 (5): 363-376. <https://doi.org/10.1080/09064710.2021.1897663>
- Zhang, S., Reddy, M.S., Kokalis-Burelle, N., Wells, L.W., Nightengale, S.P., Kloepper, J. W. (2001). Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. *Plant Disease*: 85: 879-884.
- Zubrod, P.J., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C.A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J.J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., Schäfer, R.B. (2019). Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environmental Science & Technology*: 53 (7): 3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>

X. ANEXOS

X. ANEXOS

X.1. Metodología General

X.1.1. Medios de cultivo utilizados

- AEM (agar extracto de malta): extracto de malta 20 g, peptona de soja 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua destilada hasta completar 1000 ml.
- ATS (agar tripticasa soya): producto comercial tripteína soya agar (Laboratorio Britania), 40 g, agua destilada hasta completar 1000ml.
- Caldo tripteina de soya: producto comercial tripteína soya caldo (Lab. Britania) 30 g, agua destilada hasta completar los 1000 ml.
- DRBC (agar dicloran-rosa de bengala-cloranfenicol): peptona 5 g, glucosa 10 g, MgSO₄ 7H₂O 0,5 g, KH₂PO₄ 1 g, diclorán 0,002 g, rosa de bengala 0,0025 g, cloranfenicol 0,1 g, agar 15 g, agua destilada hasta completar 1000 ml.
- King B: producto comercial *Pseudomonas* Agar o King B 38 g, agua destilada hasta completar 1000 ml.

X.1.2. Análisis de la varianza - poder germinativo

Análisis de la varianza

Poder germinativo (% plantas normales)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PG	10	0,52	0,14	33,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2154,40	4	538,60	1,35	0,3674
Tratamiento	2154,40	4	538,60	1,35	0,3674
Error	1990,00	5	398,00		
Total	4144,40	9			

X.2. Ensayos de invernadero

X.2.1. Análisis de la varianza - ensayo 2017/18

Emergencia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Emergencia	112	0,01	0,00	66,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	669,64	3	223,21	0,29	0,8331
Tratamiento	669,64	3	223,21	0,29	0,8331
Error	83348,21	108	771,74		
Total	84017,86	111			

Altura Planta

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura P	48	0,11	0,05	18,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	287,68	3	95,89	1,90	0,1438
Tratamiento	287,68	3	95,89	1,90	0,1438
Error	2222,84	44	50,52		
Total	2510,52	47			

Longitud Raíces

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Long R	48	0,03	0,00	26,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	243,83	3	81,28	0,51	0,6749
Tratamiento	243,83	3	81,28	0,51	0,6749
Error	6961,19	44	158,21		
Total	7205,02	47			

Peso Fresco Raíces

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF R	48	0,08	0,02	31,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	118,93	3	39,64	1,29	0,2882
Tratamiento	118,93	3	39,64	1,29	0,2882
Error	1347,54	44	30,63		
Total	1466,47	47			

Peso Fresco Aéreo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF aereo	48	0,02	0,00	19,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	370,49	3	123,50	0,24	0,8684
Tratamiento	370,49	3	123,50	0,24	0,8684
Error	22705,11	44	516,03		
Total	23075,60	47			

Peso Seco Aéreo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS aéreo	48	0,07	0,01	23,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	112,49	3	37,50	1,12	0,3495
Tratamiento	112,49	3	37,50	1,12	0,3495
Error	1467,08	44	33,34		
Total	1579,57	47			

Peso Seco Raíces

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS R	48	0,14	0,08	29,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,48	3	1,83	2,37	0,0838
Tratamiento	5,48	3	1,83	2,37	0,0838
Error	33,96	44	0,77		
Total	39,44	47			

Volumen Raíces

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol R	48	0,08	0,01	29,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	127,70	3	42,57	1,21	0,3175
Tratamiento	127,70	3	42,57	1,21	0,3175
Error	1548,57	44	35,19		
Total	1676,27	47			

Contenido de Nitrógeno

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Cont N	20	0,23	0,08	18,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,63	3	0,21	1,58	0,2333
Tratamiento	0,63	3	0,21	1,58	0,2333
Error	2,13	16	0,13		
Total	2,76	19			

Peso Seco Raíces - C vs P

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS R	24	0,26	0,23	21,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,78	1	3,78	7,71	0,0110
Tratamiento	3,78	1	3,78	7,71	0,0110
Error	10,78	22	0,49		
Total	14,55	23			

Volumen Raíces - C vs P

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol R	24	0,19	0,15	22,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	109,44	1	109,44	5,10	0,0341
Tratamiento	109,44	1	109,44	5,10	0,0341
Error	471,74	22	21,44		
Total	581,18	23			

Altura Planta – C vs TP

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura P	24	0,17	0,13	10,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	83,44	1	83,44	4,39	0,0478
Tratamiento	83,44	1	83,44	4,39	0,0478
Error	417,71	22	18,99		
Total	501,15	23			

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vainas	64	0,03	0,00	32,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	595,93	3	198,64	0,62	0,6037
Tratamiento	595,93	3	198,64	0,62	0,6037
Error	19171,13	60	319,52		
Total	19767,06	63			

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Granos	63	0,03	0,00	33,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	351,61	3	117,20	0,62	0,6071
Tratamiento	351,61	3	117,20	0,62	0,6071
Error	11216,67	59	190,11		
Total	11568,27	62			

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	64	0,03	0,00	46,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	327,00	3	109,00	0,57	0,6387
Tratamiento	327,00	3	109,00	0,57	0,6387
Error	11529,99	60	192,17		
Total	11856,99	63			

X.2.2. Análisis de la varianza - ensayo 2018/19**Emergencia**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Emergencia	94	0,01	0,00	34,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	387,89	2	193,95	0,42	0,6559
Tratamiento	387,89	2	193,95	0,42	0,6559
Error	41659,68	91	457,80		
Total	42047,57	93			

Altura Planta

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura P	24	5,0E-03	0,00	9,06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,02	1	1,02	0,11	0,7431
Tratamiento	1,02	1	1,02	0,11	0,7431
Error	203,95	22	9,27		
Total	204,97	23			

Longitud raíces

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Long. R	24	4,0E-03	0,00	21,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,90	1	5,90	0,09	0,7703
Tratamiento	5,90	1	5,90	0,09	0,7703
Error	1485,62	22	67,53		
Total	1491,52	23			

Peso Fresco Aéreo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF Aéreo	24	0,02	0,00	13,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	47,86	1	47,86	0,37	0,5471
Tratamiento	47,86	1	47,86	0,37	0,5471
Error	2815,28	22	127,97		
Total	2863,14	23			

Peso Fresco Raíz

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PF Raíz	24	0,20	0,17	42,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	67,07	1	67,07	5,55	0,0278
Tratamiento	67,07	1	67,07	5,55	0,0278
Error	265,69	22	12,08		
Total	332,75	23			

Peso Seco Aéreo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS Aéreo	24	0,01	0,00	15,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,21	1	1,21	0,19	0,6675
Tratamiento	1,21	1	1,21	0,19	0,6675
Error	140,43	22	6,38		
Total	141,64	23			

Peso Seco Raíz

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS Raíz	24	0,10	0,06	24,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,73	1	0,73	2,51	0,1274
Tratamiento	0,73	1	0,73	2,51	0,1274
Error	6,38	22	0,29		
Total	7,11	23			

Volumen Raíces

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vol Raíces	24	0,18	0,14	35,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	57,04	1	57,04	4,71	0,0410
Tratamiento	57,04	1	57,04	4,71	0,0410
Error	266,29	22	12,10		
Total	323,33	23			

NºFolículos enfermos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Fol enfermos	75	0,70	0,68	30,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2668,80	4	667,20	40,27	<0,0001
Tratamiento	2668,80	4	667,20	40,27	<0,0001
Error	1159,87	70	16,57		
Total	3828,67	74			

Incidencia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidencia	75	0,75	0,74	26,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18077,87	4	4519,47	52,91	<0,0001
Tratamiento	18077,87	4	4519,47	52,91	<0,0001
Error	5979,26	70	85,42		
Total	24057,13	74			

Severidad Media

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad Media	75	0,53	0,51	63,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,58	4	5,14	19,89	<0,0001
Tratamiento	20,58	4	5,14	19,89	<0,0001
Error	18,11	70	0,26		
Total	38,69	74			

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vainas	25	0,15	0,00	15,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	204,48	4	51,12	0,91	0,4779
Tratamiento	204,48	4	51,12	0,91	0,4779
Error	1125,32	20	56,27		
Total	1329,80	24			

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Granos	25	0,16	0,00	16,56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	144,79	4	36,20	0,92	0,4719
Tratamiento	144,79	4	36,20	0,92	0,4719
Error	787,20	20	39,36		
Total	931,99	24			

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Conf.	25	0,08	0,00	19,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	67,66	4	16,91	0,44	0,7750
Tratamiento	67,66	4	16,91	0,44	0,7750
Error	760,84	20	38,04		
Total	828,50	24			

X.2.3. Análisis de la varianza - ensayo 2019/20**Emergencia**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Emergencia	70	0,04	5,9E-04	36,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1055,71	3	351,90	1,01	0,3924
Tratamiento	1055,71	3	351,90	1,01	0,3924
Error	22916,20	66	347,22		
Total	23971,91	69			

X.2.4. Análisis de la varianza - ensayo 2020/21**Emergencia**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Emergencia	70	0,03	0,00	37,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1138,06	3	379,35	0,69	0,5618
Tratamiento	1138,06	3	379,35	0,69	0,5618
Error	36325,05	66	550,38		
Total	37463,11	69			

Nº Folíolos Enfermos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Fol enfermos	70	0,49	0,44	100,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,18	6	2,03	9,99	<0,0001
Tratamiento	12,18	6	2,03	9,99	<0,0001
Error	12,81	63	0,20		
Total	24,99	69			

Incidencia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidencia	70	0,43	0,38	112,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	94,63	6	15,77	8,08	<0,0001
Tratamiento	94,63	6	15,77	8,08	<0,0001
Error	123,00	63	1,95		
Total	217,63	69			

Severidad

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	70	0,30	0,23	234,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	6	0,01	4,46	0,0008
Tratamiento	0,03	6	0,01	4,46	0,0008
Error	0,07	63	1,2E-03		
Total	0,11	69			

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto vainas	70	0,16	0,08	34,12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	125,18	6	20,86	1,96	0,0851
Tratamiento	125,18	6	20,86	1,96	0,0851
Error	671,25	63	10,65		
Total	796,43	69			

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto granos	70	0,16	0,08	43,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	54,21	6	9,03	1,96	0,0848
Tratamiento	54,21	6	9,03	1,96	0,0848
Error	290,35	63	4,61		
Total	344,56	69			

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto.G. conf	70	0,09	1,7E-03	91,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,96	6	1,49	1,02	0,4207
Tratamiento	8,96	6	1,49	1,02	0,4207
Error	92,21	63	1,46		
Total	101,17	69			

X.3. Determinación de actividad enzimática**X.3.1. Soluciones empleadas**

- Buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.8 + 1 mM EDTA + 1% PVP: (a) Preparar 17,42 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4) en un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril). (b) Preparar 13,61 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril). Mezclar 9,1 ml de la solución (a) con 0,9 ml de la (b) y llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. Medir pH, este debe ser de 7.8 ± 0.02 , sino, corregir con el agregado de la solución (a) o (b), para subir o bajar el valor, respectivamente. Posteriormente agregar 0,037 g de EDTA a los 100 ml de buffer y en cada muestra de folíolos a macerar, agregar una cucharadita de PVP, aproximadamente

0,0084 g.

- Buffer acetato de sodio – ácido acético 50 mM pH 4.8: (a) Colocar 1,155 ml de ácido acético glacial en un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. (b) Colocar 2,72 g de acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$) en un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. Mezclar 20 ml de la solución (a) con 30 ml de la (b) y llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. Medir pH, este debe ser de 4.80 ± 0.02 , sino, corregir con el agregado de la solución (a) o (b), para bajar o subir el valor, respectivamente.

- Laminarina 4%: Disolver 4 g/ml o 40 mg/ml de laminarina (formulación comercial en polvo) en buffer acetato de sodio – ácido acético 50 mM pH 4.8.

- Ácido dinitrosalicílico (DNS): mezclar 100 ml de NaHO al 4% (en agua destilada estéril) y 1 g de DNS (solución comercial en polvo) en agitador orbital con temperatura (sin llegar a evaporar) por unos minutos. Posteriormente incorporar 30 g de tartrato de sodio potasio y agitar manualmente hasta lograr una solución homogénea. Conservar a temperatura ambiente, cubierto de la luz.

- Solución de glucosa 0,2%: disolver 0,2 g de glucosa en 100 ml o 2 mg/ml de agua destilada estéril.

- Buffer acetato de sodio – ácido acético 50 mM pH 5.2: se prepara de la misma manera que el de pH 4.8, solo que de la solución (a) se colocan 10,5 ml y de la solución (b) 39,2 en un volumen final de 100 ml.

- Quitina 0.5%: se colocan 0,5 g de quitina coloidal en 100 ml de buffer acetato de sodio – ácido acético 50 mM pH 5.2

- Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6.5: (a) Preparar 2,78 g de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) en un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. (b) Preparar 5,36 g de fosfato de sodio dibásico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) en un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. Mezclar 34,3 ml de la solución (a) con 15,7 ml de la (b) y llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada estéril. Medir pH, este debe ser de 6.5 ± 0.02 , sino, corregir con el agregado de la solución (a) o (b), para bajar o subir el valor, respectivamente.

- Catecol 100 mM: disolver 1,01 g de catecol en 100 ml del buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6.5.

X.3.2. Determinación de actividad β -1,3-glucanasa

Tabla A1: Muestras empleadas para medir absorbancia y obtener curva estándar de glucosa

Contenido	Muestras								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Glucosa 0,2% (μ l)	0	50	100	200	300	500	700	900	1000
Agua destilada estéril (μ l)	3000	2950	2900	2800	2700	2500	2300	2100	2000
DNS (μ l)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Volumen total (μ l)	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500
Conc. Glucosa (mg/ml)	0	0,02	0,04	0,09	0,13	0,22	0,31	0,40	0,44
Conc. Glucosa (μ l/ml)	0	22,22	44,44	88,89	133,33	222,22	311,11	400,00	444,44

Tabla A2: Valores de absorbancia obtenidos para cada concentración de glucosa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Conc. (μ l/ml)	0	22,22	44,44	88,89	133,33	222,22	311,11	400,00	444,44
Absorbancia 1	0,054	0,054	0,078	0,133	0,204	0,347	0,476	0,608	0,605
Absorbancia 2	0,065	0,064	0,070	0,068	0,088	0,147	0,151	0,213	0,288
Absorbancia 3	0,055	0,057	0,079	0,145	0,219	0,351	0,456	0,742	0,755
Abs. Promedio	0,058	0,058	0,076	0,115	0,170	0,282	0,361	0,521	0,549

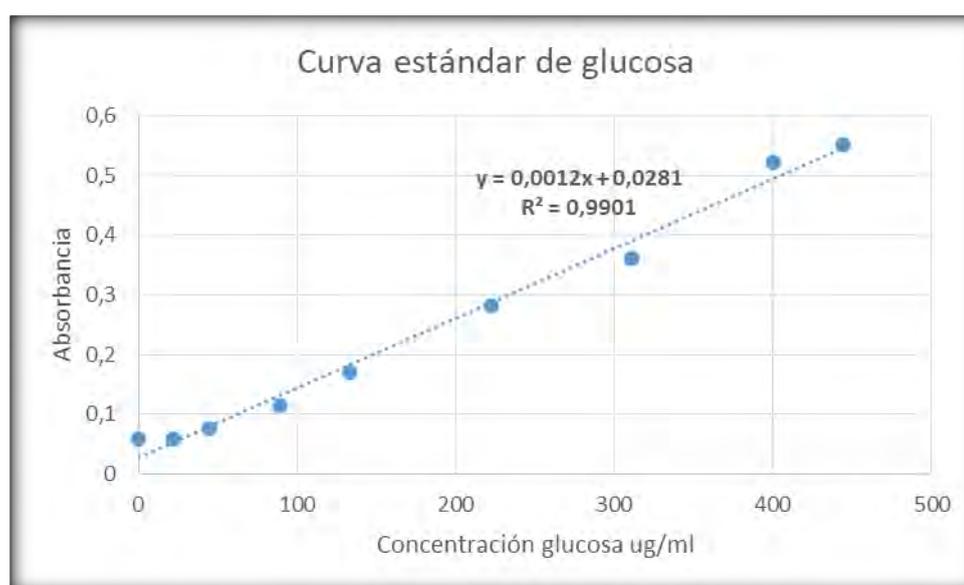


Figura A1: Curva estándar de glucosa.

X.3.2.1. Pasos para obtener unidades de actividad enzimática β -1,3-glucanasa

- Cada valor de absorbancia se multiplicó por tres (por la dilución 1/3 utilizada)
- Utilizando la función lineal de la curva estándar de glucosa, y reemplazando “y” por cada valor obtenido de absorbancia, se obtuvo un valor de “x” (concentración de glucosa en $\mu\text{g/ml}$).
- La concentración de glucosa en $\mu\text{g/ml}$, se pasó a unidades de $\mu\text{M/ml}$, considerando que un mol de glucosa pesa 180,063 g, y que un μmol pesa 180,063 μg .
- Los μM de glucosa se dividieron por el tiempo de incubación (30 minutos), obteniendo así los valores de unidad enzimática (U) para cada muestra, expresada en $\mu\text{M/min}$.
- Por último, se ajustó la concentración según el volumen de extracto a 1 ml, considerando que esos μM se obtuvieron con 62,5 μl de extracto vegetal, obteniendo así los valores de unidad de actividad enzimática (U/ml).

X.3.3. Determinación de actividad quitinasa

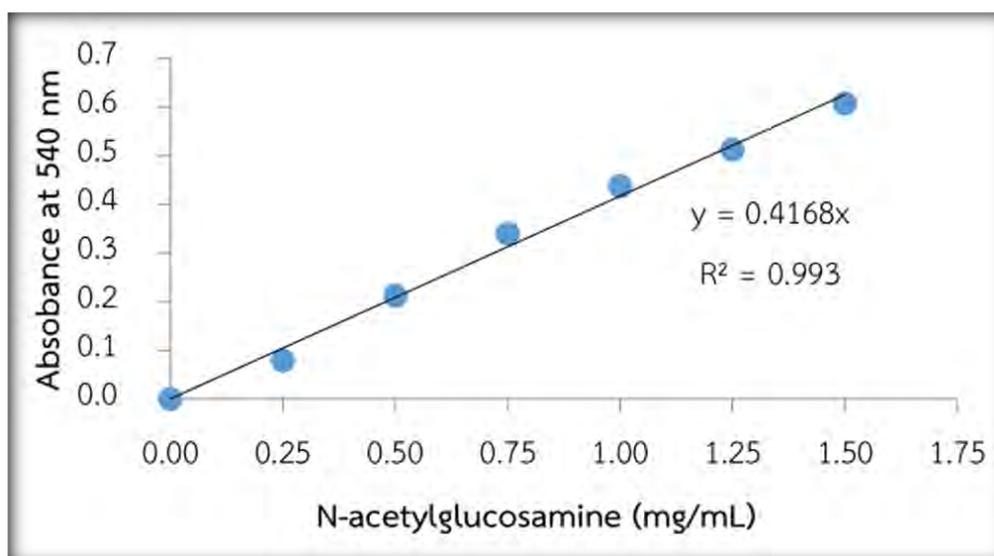


Figura A2: Curva estándar de N-acetilglucosamina, extraída de Saraihom (2016)

X.3.3.1. Pasos para obtener unidades de actividad enzimática quitinasa

- Utilizando la función lineal de la curva estándar de N-acetilglucosamina, y reemplazando “y” por cada valor obtenido de absorbancia, se obtuvo un valor de “x” (concentración de N-acetilglucosamina en mg/ml).
- La concentración de N-acetilglucosamina se pasó a $\mu\text{g/ml}$ (multiplicando por mil) y luego

a $\mu\text{M}/\text{ml}$, considerando que un μmol pesa 221,21 μg .

- Los μM de N-acetilglucosamina se dividieron por el tiempo de incubación (4 hs = 240 min), obteniendo así los valores de unidad enzimática (U) para cada muestra, expresada en $\mu\text{M}/\text{min}$.

- Por último, se ajustó la concentración según el volumen de extracto a 1 ml, considerando que esos μM se obtuvieron con 500 μl de extracto vegetal, obteniendo así los valores de unidad de actividad enzimática (U/ml).

X.3.4. Análisis de la varianza – actividades enzimática

X.3.4.1. Actividad β -1,3-glucanasa

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
0	U ($\mu\text{M}/\text{min}$)	15	0,31	0,04	8,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,13	4	0,03	1,15	0,3889
Tratamiento	0,13	4	0,03	1,15	0,3889
Error	0,28	10	0,03		
Total	0,41	14			

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	U ($\mu\text{M}/\text{min}$)	15	0,38	0,13	8,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,13	4	0,03	1,54	0,2642
Tratamiento	0,13	4	0,03	1,54	0,2642
Error	0,21	10	0,02		
Total	0,34	14			

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
8	U ($\mu\text{M}/\text{min}$)	15	0,13	0,00	8,23

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,06	4	0,01	0,39	0,8122
Tratamiento	0,06	4	0,01	0,39	0,8122
Error	0,36	10	0,04		
Total	0,42	14			

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
12	U (uM/min)	15	0,37	0,11	7,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,21	4	0,05	1,44	0,2908
Tratamiento	0,21	4	0,05	1,44	0,2908
Error	0,36	10	0,04		
Total	0,57	14			

X.3.4.2. Actividad quitinasa

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
0	U (uM/min)	15	0,77	0,60	12,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,5E-04	6	9,2E-05	4,45	0,0283
Tratamiento	3,1E-04	4	7,7E-05	3,71	0,0540
Repetición	2,4E-04	2	1,2E-04	5,91	0,0265
Error	1,6E-04	8	2,1E-05		
Total	7,1E-04	14			

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	U (uM/min)	15	0,84	0,72	17,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,6E-04	6	1,4E-04	7,13	0,0071
Tratamiento	6,2E-05	4	1,6E-05	0,77	0,5754
Repetición	8,0E-04	2	4,0E-04	19,84	0,0008
Error	1,6E-04	8	2,0E-05		
Total	1,0E-03	14			

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
8	U (uM/min)	15	0,62	0,34	10,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,6E-05	6	7,6E-06	2,21	0,1482
Tratamiento	2,6E-05	4	6,5E-06	1,88	0,2067
Repetición	2,0E-05	2	9,9E-06	2,86	0,1156
Error	2,8E-05	8	3,5E-06		
Total	7,3E-05	14			

Tiempo (días)	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
12	U (uM/min)	15	0,64	0,37	29,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,2E-04	6	1,2E-04	2,38	0,1278
Tratamiento	1,7E-04	4	4,2E-05	0,83	0,5428
Repetición	5,5E-04	2	2,7E-04	5,48	0,0318
Error	4,0E-04	8	5,0E-05		
Total	1,1E-03	14			

X.3.4.3. Actividad PPO

Tiempo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
0	Actividad	15	0,17	0,00	27,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	51,95	4	12,99	0,52	0,7256
Tratamiento	51,95	4	12,99	0,52	0,7256
Error	251,31	10	25,13		
Total	303,25	14			

Tiempo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	Actividad	15	0,12	0,00	52,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	161,49	4	40,37	0,33	0,8546
Tratamiento	161,49	4	40,37	0,33	0,8546
Error	1240,43	10	124,04		
Total	1401,92	14			

Tiempo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
8	Actividad	15	0,03	0,00	40,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27,75	4	6,94	0,08	0,9875
Tratamiento	27,75	4	6,94	0,08	0,9875
Error	894,96	10	89,50		
Total	922,71	14			

Tiempo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
12	Actividad	15	0,04	0,00	26,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,34	4	5,34	0,11	0,9769
Tratamiento	21,34	4	5,34	0,11	0,9769
Error	492,45	10	49,25		
Total	513,80	14			

X.4. Soluciones usadas para la fijación y tinción de raíces para observación en microscopio confocal

- Buffer PBS: 0,24 g H₂PO₄ 1.8 mM + 1,8 g Na₂HPO₄.2H₂O 10 mM + 0,2 g KCl 2.7 mM + 8 g NaCl 137 mM. Colocar los reactivos dentro de 800 ml de agua, medir pH, si es necesario ajustar con HCl hasta 7.4 y luego completar el litro.

- KOH 10%: 10 g de KOH en lentejas y completar 100 ml con agua.

- Soluciones stock:

100 ml PBS + 100 ul Tween 20 (0.1%)

1 ml agua destilada + 1 mg WGA

1 ml PBS + 10 mg PI

- Solución de tinción

2 µl de solución stock PI por ml de solución (se necesitan 20 µg PI cada 1ml de solución de tinción)

10000 µg (10 mg) PI ----- 1ml PBS (stock)

20 µg PI ----- X= 0.002 ml – 2µl del stock

10 µl de solución WGA por ml de solución (se necesitan 10 µg WGA cada 1ml de solución de tinción)

1000 µg (1mg) WGA ----- 1ml H₂O destilada (stock)

10 µg ----- X= 0.01ml – 10 µl del stock

La solución de tinción se prepara con 2 µl de la solución stock de PI más 10 µl de la solución stock WGA por ml de PBS con Tween 20% al 0.1%

X.5. Análisis de la varianza - ensayos de campo

X.5.1. General Cabrera campaña 2017/18

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vaina	120	0,65	0,22	21,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	12037834,17	65	185197,45	1,52	0,0567	
Curasemilla	56362,50	3	18787,50	0,31	0,8160	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	1563050,83	9	173672,31	0,92	0,5280	(Repetición*Fungicida)
Repetición	344645,00	2	172322,50	1,42	0,2515	
Curasemilla*Fungicida	6327179,17	27	234339,97	1,93	0,0203	
Repetición*Curasemilla	360375,00	6	60062,50	0,49	0,8103	
Repetición*Fungicida	3386221,67	18	188123,43	1,55	0,1101	
Error	6569958,33	54	121665,90			
Total	8607792,50	119				

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=464,0857

Error: 121665,8951 gl: 54

Curasem.	Fungicida	Medias	n	E.E.
C	7	1063,33	3	201,38 A
T	1	1143,33	3	201,38 A
T	8	1263,33	3	201,38 A
P	6	1303,33	3	201,38 A
C	8	1330,00	3	201,38 A
P	5	1343,33	3	201,38 A
T	2	1353,33	3	201,38 A
P	4	1356,67	3	201,38 A
T	7	1380,00	3	201,38 A
P	1	1396,67	3	201,38 A
C	9	1400,00	3	201,38 A
P	2	1403,33	3	201,38 A
C	6	1406,67	3	201,38 A
TP	1	1410,00	3	201,38 A
TP	7	1423,33	3	201,38 A
C	10	1423,33	3	201,38 A
T	4	1473,33	3	201,38 A
TP	4	1540,00	3	201,38 A
TP	6	1586,67	3	201,38 A
TP	3	1593,33	3	201,38 A
TP	9	1596,67	3	201,38 A
TP	2	1596,67	3	201,38 A
P	9	1633,33	3	201,38 A
TP	8	1636,67	3	201,38 A
T	6	1663,33	3	201,38 A
T	3	1673,33	3	201,38 A
TP	5	1713,33	3	201,38 A
C	4	1716,67	3	201,38 A
TP	10	1723,33	3	201,38 A

C	5	1776,67	3	201,38	B
T	10	1793,33	3	201,38	B
T	9	1846,67	3	201,38	B
C	2	1906,67	3	201,38	B
P	10	1916,67	3	201,38	B
P	7	1933,33	3	201,38	B
C	3	1940,00	3	201,38	B
C	1	1976,67	3	201,38	B
P	3	1986,67	3	201,38	B
P	8	2026,67	3	201,38	B
T	5	2140,00	3	201,38	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Grano	120	0,67	0,27	26,53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	4481440,17	65	68945,23	1,67	0,0263	
Curasemilla	151875,62	3	50625,21	2,04	0,2098	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	1049666,06	9	116629,56	1,71	0,1593	(Repetición*Fungicida)
Repetición	53524,09	2	26762,05	0,65	0,5260	
Curasemilla*Fungicida	1848816,97	27	68474,70	1,66	0,0559	
Repetición*Curasemilla	148849,16	6	24808,19	0,60	0,7270	
Repetición*Fungicida	1228708,26	18	68261,57	1,66	0,0779	
Error	2222963,78	54	41166,00			
Total	6704403,95	119				

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Confitería	120	0,67	0,28	27,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	3653208,42	65	56203,21	1,72	0,0212	
Curasemilla	108961,21	3	36320,40	1,95	0,2235	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	857306,15	9	95256,24	1,57	0,1981	(Repetición*Fungicida)
Repetición	28397,33	2	14198,66	0,43	0,6503	
Curasemilla*Fungicida	1454980,77	27	53888,18	1,65	0,0597	
Repetición*Curasemilla	111962,59	6	18660,43	0,57	0,7524	
Repetición*Fungicida	1091600,37	18	60644,46	1,85	0,0420	
Error	1767802,88	54	32737,09			
Total	5421011,30	119				

X.5.2. Vicuña Mackenna campaña 2017/18**Rendimiento en Vainas**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vaina	120	0,65	0,24	20,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	155221674,17	65	2388025,76	1,57	0,0448	
Curasemilla	9732402,50	3	3244134,17	1,13	0,4096	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	2 0511657,50	9	2279073,06	1,00	0,4724	(Repetición*Fungicida)
Repetición	15974371,67	2	7987185,83	5,25	0,0082	
Curasemilla*Fungicida	50836972,50	27	1882850,83	1,24	0,2482	
Repetición*Curasemilla	17246275,00	6	2874379,17	1,89	0,0994	
Repetición*Fungicida	40919995,00	18	2273333,06	1,49	0,1286	
Error	82141225,00	54	1521133,80			
Total	237362899,17	119				

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Grano	120	0,65	0,23	21,99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	93174943,77	65	1433460,67	1,55	0,0494	
Curasemilla	5178098,78	3	1726032,93	0,92	0,4872	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	1 1048614,01	9	1227623,78	0,86	0,5766	(Repetición*Fungicida)
Repetición	12484656,29	2	6242328,15	6,75	0,0024	
Curasemilla*Fungicida	27411024,44	27	1015223,13	1,10	0,3758	
Repetición*Curasemilla	11295064,83	6	1882510,81	2,04	0,0766	
Repetición*Fungicida	25757485,41	18	1430971,41	1,55	0,1097	
Error	49940839,03	54	924830,35			
Total	143115782,80	119				

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Confitería	120	0,63	0,19	23,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	81743472,98	65	1257591,89	1,43	0,0880	
Curasemilla	4211616,59	3	1403872,20	0,75	0,5627	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	8747478,42	9	971942,05	0,74	0,6696	(Repetición*Fungicida)
Repetición	9082925,35	2	4541462,68	5,17	0,0088	
Curasemilla*Fungicida	24756735,79	27	916916,14	1,04	0,4344	
Repetición*Curasemilla	11285049,81	6	1880841,63	2,14	0,0633	
Repetición*Fungicida	23659667,01	18	1314425,94	1,50	0,1279	
Error	47435597,93	54	878437,00			
Total	129179070,91	119				

X.5.3. General Cabrera campaña 2018/19**Incidencia final**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidencia final	120	0,93	0,84	14,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	59833,01	65	920,51	10,48	<0,0001	
Fungicida	44425,25	9	4936,14	22,84	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	8426,25	2	4213,12	47,98	<0,0001	
Curasemilla	120,84	3	40,28	0,19	0,8970	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	3890,07	18	216,12	2,46	0,0056	
Fungicida*Curasemilla	1722,78	27	63,81	0,73	0,8149	
Repetición*Curasemilla	1247,82	6	207,97	2,37	0,0420	
Error	4741,43	54	87,80			
Total	64574,44	119				

Severidad final

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad final	120	0,94	0,87	42,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	18872,52	65	290,35	13,51	<0,0001	
Fungicida	10108,09	9	1123,12	4,67	0,0026	(Repetición*Fungicida)
Repetición	3767,43	2	1883,72	87,66	<0,0001	
Curasemilla	86,86	3	28,95	0,66	0,6053	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	4325,46	18	240,30	11,18	<0,0001	
Fungicida*Curasemilla	322,01	27	11,93	0,56	0,9508	
Repetición*Curasemilla	262,65	6	43,78	2,04	0,0764	
Error	1160,40	54	21,49			
Total	20032,92	119				

Tasa de Incremento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tasa	120	0,94	0,87	42,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	7,55	65	0,12	13,51	<0,0001	
Fungicida	4,04	9	0,45	4,67	0,0026	(Repetición*Fungicida)
Repetición	1,51	2	0,75	87,66	<0,0001	
Curasemilla	0,03	3	0,01	0,66	0,6053	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	1,73	18	0,10	11,18	<0,0001	
Fungicida*Curasemilla	0,13	27	4,8E-03	0,56	0,9508	
Repetición*Curasemilla	0,11	6	0,02	2,04	0,0764	
Error	0,46	54	0,01			
Total	8,01	119				

ABCPE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABCPE	120	0,94	0,88	41,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	3082242,98	65	47419,12	13,95	<0,0001	
Fungicida	1636707,09	9	181856,34	4,73	0,0025	(Repetición*Fungicida)
Repetición	637336,09	2	318668,05	93,73	<0,0001	
Curasemilla	15211,78	3	5070,59	0,65	0,6090	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	691815,62	18	38434,20	11,30	<0,0001	
Fungicida*Curasemilla	54669,25	27	2024,79	0,60	0,9275	
Repetición*Curasemilla	46503,16	6	7750,53	2,28	0,0493	
Error	183594,73	54	3399,90			
Total	3265837,71	119				

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vainas	120	0,72	0,39	14,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	77917036,52	65	1198723,64	2,19	0,0018	
Fungicida	10557159,32	9	1173017,70	0,86	0,5787	(Repetición*Fungicida)
Repetición	10191407,98	2	5095703,99	9,30	0,0003	
Curasemilla	2137998,20	3	712666,07	1,75	0,2556	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	24689519,81	18	1371639,99	2,50	0,0049	
Fungicida*Curasemilla	27901789,69	27	1033399,62	1,89	0,0237	
Repetición*Curasemilla	2439161,53	6	406526,92	0,74	0,6180	
Error	29575644,02	54	547697,11			
Total	107492680,54	119				

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1129,0067

Error: 547697,1115 gl: 54

Fungicida	Curasemilla	Medias	n	E.E.
4	P	4015,33	3	427,28 A
9	P	4383,40	3	427,28 A
4	TP	4387,37	3	427,28 A
1	C	4389,97	3	427,28 A
6	C	4395,30	3	427,28 A
7	C	4417,23	3	427,28 A
8	C	4443,33	3	427,28 A
3	T	4486,60	3	427,28 A
2	TP	4574,03	3	427,28 A
1	T	4598,17	3	427,28 A
6	T	4624,93	3	427,28 A
1	TP	4710,13	3	427,28 A
9	C	4711,07	3	427,28 A
7	TP	4745,77	3	427,28 A
2	C	4849,83	3	427,28 A
5	TP	4869,03	3	427,28 A

6	P	4919,43	3	427,28	A
7	T	4980,77	3	427,28	A
4	C	4997,13	3	427,28	A
8	P	4997,60	3	427,28	A
5	C	5044,57	3	427,28	A
7	P	5086,77	3	427,28	A
10	T	5099,93	3	427,28	A
6	TP	5102,30	3	427,28	A
10	P	5231,17	3	427,28	A
9	TP	5254,57	3	427,28	A
4	T	5282,30	3	427,28	A
5	T	5303,80	3	427,28	A
2	P	5340,30	3	427,28	A
8	TP	5494,20	3	427,28	A
3	TP	5509,67	3	427,28	A
3	C	5801,03	3	427,28	B
1	P	5864,47	3	427,28	B
8	T	5872,63	3	427,28	B
10	C	5879,77	3	427,28	B
9	T	5895,53	3	427,28	B
5	P	5927,90	3	427,28	B
3	P	5944,17	3	427,28	B
10	TP	6218,27	3	427,28	B
2	T	6377,10	3	427,28	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Granos	120	0,76	0,47	16,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	40135331,82	65	617466,64	2,60	0,0002	
Fungicida	5023512,94	9	558168,10	1,14	0,3863	(Repetición*Fungicida)
Repetición	12622495,47	2	6311247,73	26,60	<0,0001	
Curasemilla	1487749,53	3	495916,51	2,04	0,2104	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	8812484,86	18	489582,49	2,06	0,0211	
Fungicida*Curasemilla	10727721,29	27	397323,01	1,67	0,0536	
Repetición*Curasemilla	1461367,73	6	243561,29	1,03	0,4183	
Error	12812253,62	54	237263,96			
Total	52947585,43	119				

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	120	0,74	0,42	18,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	34469501,35	65	530300,02	2,32	0,0009	
Fungicida	4610358,60	9	512262,07	1,18	0,3636	(Repetición*Fungicida)
Repetición	9694342,12	2	4847171,06	21,20	<0,0001	
Curasemilla	1692461,01	3	564153,67	1,93	0,2264	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	7811830,41	18	433990,58	1,90	0,0362	
Fungicida*Curasemilla	8904152,09	27	329783,41	1,44	0,1254	
Repetición*Curasemilla	1756357,12	6	292726,19	1,28	0,2819	
Error	12347886,72	54	228664,57			
Total	46817388,07	119				

Rendimiento en Granos Confitería C vs T

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	60	0,07	0,06	23,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1513557,78	1	1513557,78	4,50	0,0381
Curasemilla	1513557,78	1	1513557,78	4,50	0,0381
Error	19499385,55	58	336196,30		
Total	21012943,33	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=299,6771*Error: 336196,3026 gl: 58*

Curasemilla	Medias	n	E.E.
C	2350,26	30	105,86 A
T	2667,92	30	105,86 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)***X.5.4. Vicuña Mackenna campaña 2018/19****Incidencia**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidencia	120	0,89	0,75	70,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	24720,24	65	380,31	6,44	<0,0001	
Fungicida	14400,69	9	1600,08	4,70	0,0026	(Repetición*Fungicida)
Repetición	1984,48	2	992,24	16,81	<0,0001	
Curasemilla	290,06	3	96,69	0,65	0,6117	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	6126,62	18	340,37	5,76	<0,0001	
Fungicida*Curasemilla	1024,71	27	37,95	0,64	0,8933	
Repetición*Curasemilla	893,69	6	148,95	2,52	0,0317	
Error	3188,27	54	59,04			
Total	27908,51	119				

Severidad

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	120	0,74	0,43	150,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	13,79	65	0,21	2,38	0,0006	
Fungicida	6,99	9	0,78	3,82	0,0075	(Repetición*Fungicida)
Repetición	1,23	2	0,62	6,91	0,0021	
Curasemilla	0,14	3	0,05	0,35	0,7905	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	3,66	18	0,20	2,29	0,0101	
Fungicida*Curasemilla	0,94	27	0,03	0,39	0,9951	
Repetición*Curasemilla	0,82	6	0,14	1,54	0,1832	
Error	4,81	54	0,09			
Total	18,60	119				

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vainas	120	0,54	0,00	15,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	41232905,72	65	634352,40	0,99	0,5187	
Fungicida	6201605,36	9	689067,26	0,92	0,5267	(Repetición*Fungicida)
Repetición	466352,07	2	233176,04	0,36	0,6967	
Curasemilla	5426459,70	3	1808819,90	2,44	0,1624	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	13409369,21	18	744964,96	1,16	0,3237	
Fungicida*Curasemilla	11279858,97	27	417772,55	0,65	0,8858	
Repetición*Curasemilla	4449260,41	6	741543,40	1,16	0,3428	
Error	34604719,48	54	640828,14			
Total	75837625,19	119				

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Granos	120	0,53	0,00	17,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	22809491,12	65	350915,25	0,93	0,6181	
Fungicida	3906420,35	9	434046,71	1,04	0,4502	(Repetición*Fungicida)
Repetición	201192,76	2	100596,38	0,27	0,7678	
Curasemilla	2661867,37	3	887289,12	1,92	0,2273	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	7 540974,14	18	418943,01	1,11	0,3721	
Fungicida*Curasemilla	5728560,12	27	212168,89	0,56	0,9481	
Repetición*Curasemilla	2770476,38	6	461746,06	1,22	0,3110	
Error	20453653,81	54	378771,37			
Total	43263144,93	119				

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	120	0,53	0,00	19,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	21525696,39	65	331164,56	0,93	0,6075	
Fungicida	3831861,14	9	425762,35	1,12	0,3969	(Repetición*Fungicida)
Repetición	529884,66	2	264942,33	0,75	0,4788	
Curasemilla	2269127,75	3	756375,92	1,63	0,2783	(Repetición*Curasemilla)
Repetición*Fungicida	6831411,06	18	379522,84	1,07	0,4058	
Fungicida*Curasemilla	5286271,78	27	195787,84	0,55	0,9524	
Repetición*Curasemilla	2777140,01	6	462856,67	1,30	0,2711	
Error	19163390,75	54	354877,61			
Total	40689087,14	119				

X.5.5. General Cabrera campaña 2019/20**Incidencia final**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidencia	120	0,79	0,53	20,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	32013,45	65	492,51	3,04	<0,0001	
Curasemilla	517,29	3	172,43	0,86	0,5122	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	20172,45	9	2241,38	10,87	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	1018,00	2	509,00	3,15	0,0511	
Curasemilla*Fungicida	5388,10	27	199,56	1,23	0,2520	
Repetición*Curasemilla	1207,11	6	201,19	1,24	0,2993	
Repetición*Fungicida	3710,49	18	206,14	1,27	0,2419	
Error	8739,56	54	161,84			
Total	40753,01	119				

Severidad final

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	120	0,95	0,89	29,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	63376,40	65	975,02	16,29	<0,0001	
Curasemilla	110,06	3	36,69	0,26	0,8491	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	55146,10	9	6127,34	29,81	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	312,54	2	156,27	2,61	0,0827	
Curasemilla*Fungicida	3274,63	27	121,28	2,03	0,0137	
Repetición*Curasemilla	833,59	6	138,93	2,32	0,0457	
Repetición*Fungicida	3699,47	18	205,53	3,43	0,0002	
Error	3231,70	54	59,85			
Total	66608,10	119				

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=12,1134

Error: 205,5264 gl: 18

Fungicida	Medias	n	E.E.	
4	6,47	12	4,14	A
3	7,24	12	4,14	A
9	9,27	12	4,14	A
10	18,51	12	4,14	B
6	20,88	12	4,14	B
2	25,85	12	4,14	B
8	26,56	12	4,14	B
7	27,21	12	4,14	B
5	33,27	12	4,14	B
1	84,70	12	4,14	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=14,2702

Error: 59,8462 gl: 54

Curasem.	Fung.	Medias	n	E.E.	
C	4	2,38	3	4.47	A
TP	4	3,27	3	4.47	A
P	3	4,19	3	4.47	A
T	3	5,52	3	4.47	A
T	4	5,68	3	4.47	A
TP	9	5,71	3	4.47	A
TP	3	9,13	3	4.47	A
T	9	9,48	3	4.47	A
C	9	9,74	3	4.47	A
C	3	10,10	3	4.47	A
P	9	12,17	3	4.47	A
P	4	14,56	3	4.47	A
T	10	15,23	3	4.47	A
P	6	16,15	3	4.47	A
TP	10	16,49	3	4.47	A
T	6	16,69	3	4.47	A
TP	6	17,32	3	4.47	A
P	2	18,48	3	4.47	A
P	10	18,86	3	4.47	A
C	7	21,61	3	4.47	B
C	10	23,47	3	4.47	B
TP	2	24,55	3	4.47	B
P	8	24,78	3	4.47	B
C	5	25,89	3	4.47	B
T	7	26,12	3	4.47	B
P	7	26,49	3	4.47	B
TP	8	26,94	3	4.47	B
T	8	26,97	3	4.47	B
C	8	27,57	3	4.47	B
P	5	29,02	3	4.47	B
T	2	30,00	3	4.47	B
C	2	30,37	3	4.47	B
TP	5	30,68	3	4.47	B
C	6	33,35	3	4.47	B
TP	7	34,61	3	4.47	B
T	5	47,49	3	4.47	C

T	1	70,88	3	4.47	D	
TP	1	85,85	3	4.47		E
P	1	89,99	3	4.47		E
C	1	92,07	3	4.47		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tasa de Incremento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Tasa	120	0,95	0,89	29,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	23,43	65	0,36	16,28	<0,0001	
Curasemilla	0,04	3	0,01	0,27	0,8443	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	20,39	9	2,27	30,03	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	0,11	2	0,06	2,58	0,0849	
Curasemilla*Fungicida	1,22	27	0,05	2,04	0,0131	
Repetición*Curasemilla	0,30	6	0,05	2,29	0,0486	
Repetición*Fungicida	1,36	18	0,08	3,41	0,0002	
Error	1,20	54	0,02			
Total	24,62	119				

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2321

Error: 0,0754 gl: 18

Fungicida	Medias	n	E.E.	
4	0,13	12	0,08	A
3	0,14	12	0,08	A
9	0,18	12	0,08	A
10	0,36	12	0,08	B
6	0,40	12	0,08	B
2	0,50	12	0,08	B
8	0,51	12	0,08	B
7	0,52	12	0,08	B
5	0,64	12	0,08	B
1	1,63	12	0,08	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2744

Error: 0,0221 gl: 54

Curasem.	Fung.	Medias	n	E.E.	
C	4	0,05	3	0,09	A
TP	4	0,06	3	0,09	A
P	3	0,08	3	0,09	A
T	3	0,11	3	0,09	A
TP	9	0,11	3	0,09	A
T	4	0,11	3	0,09	A
TP	3	0,18	3	0,09	A
T	9	0,18	3	0,09	A
C	9	0,19	3	0,09	A
C	3	0,19	3	0,09	A
P	9	0,23	3	0,09	A
P	4	0,28	3	0,09	A
T	10	0,29	3	0,09	A
P	6	0,31	3	0,09	A

T	6	0,32	3	0,09	A				
TP	10	0,32	3	0,09	A				
TP	6	0,33	3	0,09	A				
P	2	0,35	3	0,09	A				
P	10	0,36	3	0,09	A				
C	7	0,42	3	0,09		B			
C	10	0,45	3	0,09		B			
TP	2	0,47	3	0,09		B			
P	8	0,48	3	0,09		B			
C	5	0,49	3	0,09		B			
T	7	0,50	3	0,09		B			
P	7	0,51	3	0,09		B			
TP	8	0,52	3	0,09		B			
T	8	0,52	3	0,09		B			
C	8	0,53	3	0,09		B			
P	5	0,56	3	0,09		B			
T	2	0,58	3	0,09		B			
C	2	0,59	3	0,09		B			
TP	5	0,59	3	0,09		B			
C	6	0,64	3	0,09		B			
TP	7	0,66	3	0,09		B			
T	5	0,91	3	0,09			C		
T	1	1,36	3	0,09				D	
TP	1	1,65	3	0,09					E
P	1	1,73	3	0,09					E
C	1	1,77	3	0,09					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ABCPE

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABCPE	120	0,95	0,90	28,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	11576984,52	65	178107,45	16,62	<0,0001	
Curasemilla	20469,01	3	6823,00	0,26	0,8525	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	10083243,84	9	1120360,43	30,14	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	80576,25	2	40288,12	3,76	0,0296	
Curasemilla*Fungicida	565542,22	27	20946,01	1,95	0,0182	
Repetición*Curasemilla	157962,93	6	26327,16	2,46	0,0357	
Repetición*Fungicida	669190,26	18	37177,24	3,47	0,0002	
Error	578646,62	54	10715,68			
Total	12155631,14	119				

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=162,9186

Error: 37177,2369 gl: 18

Fungicida	Medias	n	E.E.	
4	89,40	12	55,66	A
3	101,58	12	55,66	A
9	128,29	12	55,66	A
10	273,85	12	55,66	B
6	302,45	12	55,66	B
2	363,58	12	55,66	B

8	375,36	12	55,66	B
7	395,75	12	55,66	B
5	470,03	12	55,66	B
1	148,96	12	55,66	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=190,9502

Error: 10715,6782 gl: 54

Curasem.	Fungicida	Medias	n	E.E.			
C	4	36,84	3	59,77	A		
TP	4	50,18	3	59,77	A		
P	3	56,97	3	59,77	A		
T	3	76,38	3	59,77	A		
TP	9	78,51	3	59,77	A		
T	4	79,35	3	59,77	A		
TP	3	129,31	3	59,77	A		
T	9	130,44	3	59,77	A		
C	9	139,71	3	59,77	A		
C	3	143,67	3	59,77	A		
P	9	164,51	3	59,77	A		
P	4	191,24	3	59,77	A		
T	10	231,79	3	59,77		B	
TP	10	235,59	3	59,77		B	
P	6	244,24	3	59,77		B	
T	6	246,59	3	59,77		B	
TP	6	251,16	3	59,77		B	
P	2	266,48	3	59,77		B	
P	10	292,62	3	59,77		B	
C	7	328,80	3	59,77		B	
C	10	335,39	3	59,77		B	
TP	2	343,88	3	59,77		B	
P	8	368,78	3	59,77		B	
TP	8	374,91	3	59,77		B	
C	8	375,57	3	59,77		B	
P	7	375,68	3	59,77		B	
T	8	382,17	3	59,77		B	
T	7	382,69	3	59,77		B	
C	5	384,47	3	59,77		B	
P	5	402,45	3	59,77		B	
C	2	416,80	3	59,77		B	
T	2	427,16	3	59,77		B	
TP	5	432,38	3	59,77		B	
C	6	467,79	3	59,77		B	
TP	7	495,82	3	59,77		B	
T	5	660,80	3	59,77			C
T	1	970,11	3	59,77			D
TP	1	1163,87	3	59,77			E
P	1	1216,36	3	59,77			E
C	1	1245,50	3	59,77			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vainas	120	0,62	0,17	25,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	88135239,97	65	1355926,77	1,37	0,1193	
Curasemilla	1808717,97	3	602905,99	0,37	0,7749	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	12135655,50	9	1348406,17	0,89	0,5528	(Repetición*Fungicida)
Repetición	21713221,07	2	10856610,53	10,94	0,0001	
Curasemilla*Fungicida	15532817,70	27	575289,54	0,58	0,9372	
Repetición*Curasemilla	9658634,13	6	1609772,36	1,62	0,1588	
Repetición*Fungicida	27286193,60	18	1515899,64	1,53	0,1164	
Error	53578719,20	54	992198,50			
Total	141713959,17	119				

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Granos	120	0,67	0,27	29,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	31099774,00	65	478458,06	1,69	0,0245	
Curasemilla	536831,35	3	178943,78	0,17	0,9160	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	3591931,99	9	399103,55	1,01	0,4645	(Repetición*Fungicida)
Repetición	6260046,42	2	3130023,21	11,05	0,0001	
Curasemilla*Fungicida	7132376,02	27	264162,07	0,93	0,5680	
Repetición*Curasemilla	6496171,14	6	1082695,19	3,82	0,0030	
Repetición*Fungicida	7082417,08	18	393467,62	1,39	0,1755	
Error	15302529,76	54	283380,18			
Total	46402303,76	119				

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	120	0,70	0,33	29,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	24021567,10	65	369562,57	1,90	0,0081	
Curasemilla	334920,91	3	111640,30	0,14	0,9324	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	3790725,65	9	421191,74	1,40	0,2604	(Repetición*Fungicida)
Repetición	3823408,92	2	1911704,46	9,83	0,0002	
Curasemilla*Fungicida	5858966,80	27	216998,77	1,12	0,3576	
Repetición*Curasemilla	4786002,36	6	797667,06	4,10	0,0018	
Repetición*Fungicida	5427542,45	18	301530,14	1,55	0,1088	
Error	10504733,67	54	194532,11			
Total	34526300,77	119				

X.5.6. Vicuña Mackenna campaña 2019/20**Incidencia**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidencia	120	0,74	0,42	101,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	2143,00	65	32,97	2,31	0,0009	
Curasemilla	34,60	3	11,53	0,37	0,7790	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	1406,14	9	156,24	23,52	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	53,22	2	26,61	1,86	0,1650	
Curasemilla*Fungicida	341,62	27	12,65	0,89	0,6258	
Repetición*Curasemilla	187,87	6	31,31	2,19	0,0577	
Repetición*Fungicida	119,55	18	6,64	0,47	0,9622	
Error	771,08	54	14,28			
Total	2914,07	119				

Severidad

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	120	0,69	0,32	122,73

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	0,14	65	2,1E-03	1,85	0,0105	
Curasemilla	1,8E-03	3	6,1E-04	0,24	0,8656	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	0,08	9	0,01	15,04	<0,0001	(Repetición*Fungicida)
Repetición	3,4E-03	2	1,7E-03	1,49	0,2353	
Curasemilla*Fungicida	0,02	27	8,1E-04	0,70	0,8382	
Repetición*Curasemilla	0,02	6	2,6E-03	2,23	0,0536	
Repetición*Fungicida	0,01	18	6,2E-04	0,54	0,9229	
Error	0,06	54	1,1E-03			
Total	0,20	119				

Rendimiento en Vainas

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Vainas	120	0,65	0,23	21,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	81669659,03	65	1256456,29	1,54	0,0510	
Curasemilla	5412742,77	3	1804247,59	0,69	0,5898	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	12232966,70	9	1359218,52	1,87	0,1228	(Repetición*Fungicida)
Repetición	11423249,07	2	5711624,53	7,02	0,0020	
Curasemilla*Fungicida	23889275,57	27	884787,98	1,09	0,3870	
Repetición*Curasemilla	15655149,33	6	2609191,56	3,21	0,0091	
Repetición*Fungicida	13056275,60	18	725348,64	0,89	0,5908	
Error	43950499,33	54	813898,14			
Total	25620158,37	119				

Rendimiento en Granos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto Granos	120	0,63	0,19	22,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	47393098,58	65	729124,59	1,42	0,0924	
Curasemilla	3855285,52	3	1285095,17	0,88	0,5045	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	7305233,65	9	811692,63	1,77	0,1453	(Repetición*Fungicida)
Repetición	6294123,37	2	3147061,69	6,14	0,0040	
Curasemilla*Fungicida	12859296,35	27	476270,24	0,93	0,5727	
Repetición*Curasemilla	8810779,03	6	1468463,17	2,86	0,0171	
Repetición*Fungicida	8268380,66	18	459354,48	0,90	0,5861	
Error	27700245,27	54	512967,51			
Total	75093343,86	119				

Rendimiento en Granos Confitería

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	120	0,63	0,19	25,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	41206633,27	65	633948,20	1,44	0,0864	
Curasemilla	3911790,87	3	1303930,29	1,10	0,4193	(Repetición*Curasemilla)
Fungicida	5991576,50	9	665730,72	1,90	0,1187	(Repetición*Fungicida)
Repetición	7630981,76	2	3815490,88	8,64	0,0006	
Curasemilla*Fungicida	10234046,35	27	379038,75	0,86	0,6606	
Repetición*Curasemilla	7115925,50	6	1185987,58	2,69	0,0235	
Repetición*Fungicida	6322312,29	18	351239,57	0,80	0,6964	
Error	23845108,78	54	441576,09			
Total	65051742,06	119				

Rendimiento en Granos Confitería C vs T

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rto G Confitería	60	0,08	0,07	27,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2847813,63	1	2847813,63	5,21	0,0262
Curasemilla	2847813,63	1	2847813,63	5,21	0,0262
Error	31715076,48	58	546811,66		
Total	34562890,12	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=382,1871

Error: 546811,6635 gl: 58

Curasemilla	Medias	n	E.E.
C	2453,46	30	135,01 A
T	2889,18	30	135,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)