

EFFECTO DE LA APLICACION SECUENCIAL DE FUNGICIDAS SOBRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS VESICULO-ARBUSCULARES EN CONDICIONES DE CAMPO

Marta N. Cabello

Instituto Spegazzini, 53 N° 477, 1900, La Plata
República Argentina.

Palabras clave: Micorrizas vesículo-arbusculares, fungicidas, benomilo, mancozeb.

Key Words: Vesicular-arbuscular mycorrhizae, fungicides, benomyl, mancozeb.

RESUMEN

Se estudió, en condiciones de campo, el efecto de la aplicación secuencial de los fungicidas benomilo (sistémico) y mancozeb (de contacto), sobre la colonización vesículo-arbuscular en raíces de plantas de trigo y sobre la producción de esporas de hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares.

Estos fungicidas no afectaron la evolución de la colonización micorrízica de las raíces, la cual siguió una curva sigmoide típica en todos los tratamientos; pero hicieron que variara la calidad de la misma, reduciendo el porcentaje de arbusculos y aumentando el número de vesículas. Sin embargo la aplicación secuencial produjo una disminución del "plateau" de las curvas en las parcelas tratadas cuando se las compara con la testigo.

El número de sus esporas en el suelo no fue afectado por estos tratamientos.

SUMMARY

[Effect of sequential application of fungicides on vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi in field conditions]

Two fungicides: benomyl and mancozeb were applied sequentially on a wheat crop and their effects on root colonization and spore number in rizospheric soil was studied.

The sequential application of fungicides did not affect the root colonization, but the percentage of arbuscular infection and "plateau" was lower, and the vesicle number was higher than in the control.

These treatments did not affect their spore number in the soil.

INTRODUCCION

El desarrollo y uso de fungicidas para el control de enfermedades en plantas de interés agronómico se ha centrado en los efectos que estos productos poseen sobre los patógenos. Sin embargo, estos compuestos no son específicos para patógenos en particular, por lo cual eliminan también una amplia variedad de otros microorganismos que crecen normalmente en el suelo (Domsch, 1964). Estudios recientes indican que ciertos fungicidas previenen el desarrollo de hongos formadores de micorrizas vesículo - arbusculares (MVA) en raíces

de plantas hospedadoras.

Estas investigaciones son de particular importancia si tomamos en consideración que los hongos MVA están en asociación simbiótica con gran número de plantas de interés comercial, y el uso amplio de elementos tóxicos son, hoy en día, prácticas agrícolas corrientes.

Los hongos MVA, comunes en todos los suelos, al asociarse con las raíces de las plantas, mejoran la toma de nutrientes, especialmente del fósforo, sobre todo en suelos donde este elemento está en deficiencia (Gerdemann, 1975; Mosse & Tinker,

1980). De allí que el valor de la aplicación de fungicidas como práctica agrícola, pueda ser parcialmente compensada por los efectos colaterales de estos productos sobre las poblaciones de MVA.

En la mayoría de los estudios de interacción entre MVA y el fungicida benomilo, se han utilizado los datos de una sola cosecha, después de una única aplicación del fungicida, generalmente en plantas que crecían en condiciones de invernadero (Boatman et al., 1978; Fitter & Nichols, 1988; Jalali & Domsch, 1975; Manjunath & Bagyaraj, 1984; Plenchette & Perrin, 1992) o bien se han intentado estudios de plantas cosechadas secuencialmente, pero también en ensayos en macetas mantenidas en condiciones de invernáculo (Bertoldi et al., 1977; Hale & Sanders, 1982; Kough et al., 1987). Rhodes & Larsen (1981) estudiaron el efecto de dos aplicaciones secuenciales de este mismo fungicida en ensayos de campo.

El efecto del mancozeb sobre hongos MVA ha sido poco estudiado. Plenchette & Perrin, (1992) probaron su acción sobre la colonización de raíces de plantas de trigo y puerro en macetas en invernáculo. Sieverding, (1991) también cita su uso en combinación con maneb en estacas de mandioca, las que eran sumergidas en la mezcla y luego colocadas en macetas en invernadero. Sreenivasa & Bagyaraj, (1989) utilizaron este fungicida para la producción de inóculo MVA. Trappe et al., (1984) en una revisión de las reacciones de hongos micorrízicos y pesticidas, citan el uso del mancozeb por Jalali & Domsch; sin embargo el fungicida utilizado por estos autores es el maneb que se diferencia del mancozeb por la falta de iones de zinc en su molécula, además de ser más tóxico que el mancozeb.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de 2 fungicidas: benomilo y mancozeb, aplicados secuencialmente, sobre la colonización de raíces de plantas de trigo, la producción de esporas en suelo rizosférico de hongos MVA en condiciones de campo y la influencia de estos agroquímicos sobre la morfología intraradicular de los endófitos vesículo-arbusculares.

MATERIALES Y METODOS

El sitio donde se realizó este estudio corresponde a una parcela experimental la cual se sembró con trigo, dentro de la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (U. N. L. P.).

El suelo de la parcela corresponde a un Argiudol típico, con horizonte argílico a los 60 cm de profundidad, con un pH de 5.8-6.2 y tenores de fósforo asimilable de

16 ppm.

Los tratamientos con fungicidas fueron los siguientes:

Tratamiento 1: aplicación de benomilo (Metil 1- (butylcarbomomyl) -2- benzimidazole carbamato), 250 g de ingrediente activo por hectárea, (dosis comercialmente recomendada).

Tratamiento 2: aplicación de mancozeb (producto de coordinación de iones de Zn con etilen-bis-ditiocarbamato de Mn), 2 kg de ingrediente activo por hectárea, (dosis comercialmente recomendada).

Tratamiento 3: aplicación combinando benomilo y mancozeb en las mismas dosis que en los tratamientos 1 y 2.

Tratamiento 4: testigo no tratado, pulverizado sólo con agua.

La primera aplicación de los fungicidas se efectuó a las 48 hs de realizada la siembra, antes de que las semillas hubiesen germinado. Las restantes aplicaciones fueron realizadas a intervalos mensuales.

Los muestreos se efectuaron periódicamente a partir de los 20 días de realizada la siembra y hasta la madurez de las espigas.

Un gramo de raíces cortadas en trozos de 1 cm de longitud fue clarificado y teñido siguiendo la técnica de Phillips & Hayman (1970), evaluándose la longitud de la raíz colonizada, el porcentaje de infección arbuscular y el número de vesículas con el método propuesto por Ocampo et al. (1980).

La estimación del número de esporas de *Endogonaceae* en el suelo rizosférico se realizó tamizando 50 g de suelo según la técnica de Gerdemann & Nicolson (1963) utilizando tamices con un poro de 425, 250, 105 y 75 μ m.

La observación de los efectos de los fungicidas sobre hongos MVA se hizo en condiciones de campo con endófitos nativos sin identificar el simbionte involucrado en la posterior colonización de las raíces.

RESULTADOS

La evolución de la micorrización de plantas de trigo del tratamiento testigo y los 3 tratamientos con fungicidas puede verse en la Figura 1.

Estos fungicidas no afectaron la evolución de la micorrización, siendo la curva de colonización una curva sigmoide típica, no obstante los 3 tratamientos con estos productos mostraron desde un comienzo diferencias significativas en los porcentajes de colonización cuando se los compara con el testigo. Los fungici-

das benomilo y mancozeb cuando fueron probados aisladamente, mostraron sus efectos nocivos en la micorrización a partir de la segunda aplicación. La combinación de ambos fungicidas fue nociva para la micorrización en plantas de 20 días (Fig 1).

En el tratamiento con benomilo se produjo una estabilización del porcentaje de micorrización en plantas de 40 a 68 días en el que las plantas tenían un 35,35% de longitud de raíz micorrizada incrementándose posteriormente hasta un 63,2% a los 124 días (Fig 1).

En el tratamiento con mancozeb la fase logarítmica duró hasta los 56 días a partir de los cuales se estabilizó alcanzando un 52,98% de micorrización a los 124 días (Fig 1).

En el tratamiento donde se combinó benomilo y mancozeb la colonización se estabilizó entre 40 hasta 68 días incrementándose hasta los 96 días en donde alcanzó un 62,15% (Fig 1.).

El porcentaje de infección medida en estado arbuscular en el tratamiento testigo se incrementó paulatinamente hasta alcanzar su máximo nivel en plantas de 80 días para luego decrecer y desaparecer en plantas senescentes de 124 días (Fig 2).

El tratamiento con benomilo mostró un porcentaje más bajo de arbusculos cuando se lo compara con el testigo hasta los 96 días de las plantas, época en la cual este porcentaje alcanza su máximo nivel (Fig 2).

El mancozeb solo o combinado con el benomilo posee efectos más marcados sobre el porcentaje de

infección arbuscular. En el tratamiento con mancozeb su número es relativamente bajo, su máximo nivel ocurre en plantas de 112 días, mientras que en el tratamiento con mancozeb y benomilo entre los 56 y 80 días existe un "plateau" que decae bruscamente a los 96 días para desaparecer este tipo de infección a los 112 días (Fig 2).

El número de vesículas por cm de raíz se incrementó en el tratamiento testigo durante la etapa comprendida entre los 40 y 68 días, alcanzando el máximo de desarrollo a los 68 días de crecimiento de las plantas, manteniéndose su número casi constante hasta el final del ensayo (Fig. 3).

En los tratamientos con fungicidas las vesículas aparecieron en estadios posteriores de las plantas en relación a la parcela testigo, sin embargo su número fue marcadamente más alto.

En el tratamiento con benomilo aparecen vesículas en raíces de plantas de 68 días y su máximo número se presenta a los 124 días. En el tratamiento con mancozeb las vesículas aparecen a los 68 días de desarrollo de las plantas y su número aumenta bruscamente para alcanzar su nivel máximo a los 96 días. En el tratamiento de benomilo y mancozeb aparecen vesículas a los 96 días y su número es el máximo en esta etapa (Fig 3).

No se observó efecto de ninguno de los tratamientos sobre la producción de esporas por los endófitos MVA (Tabla 1).

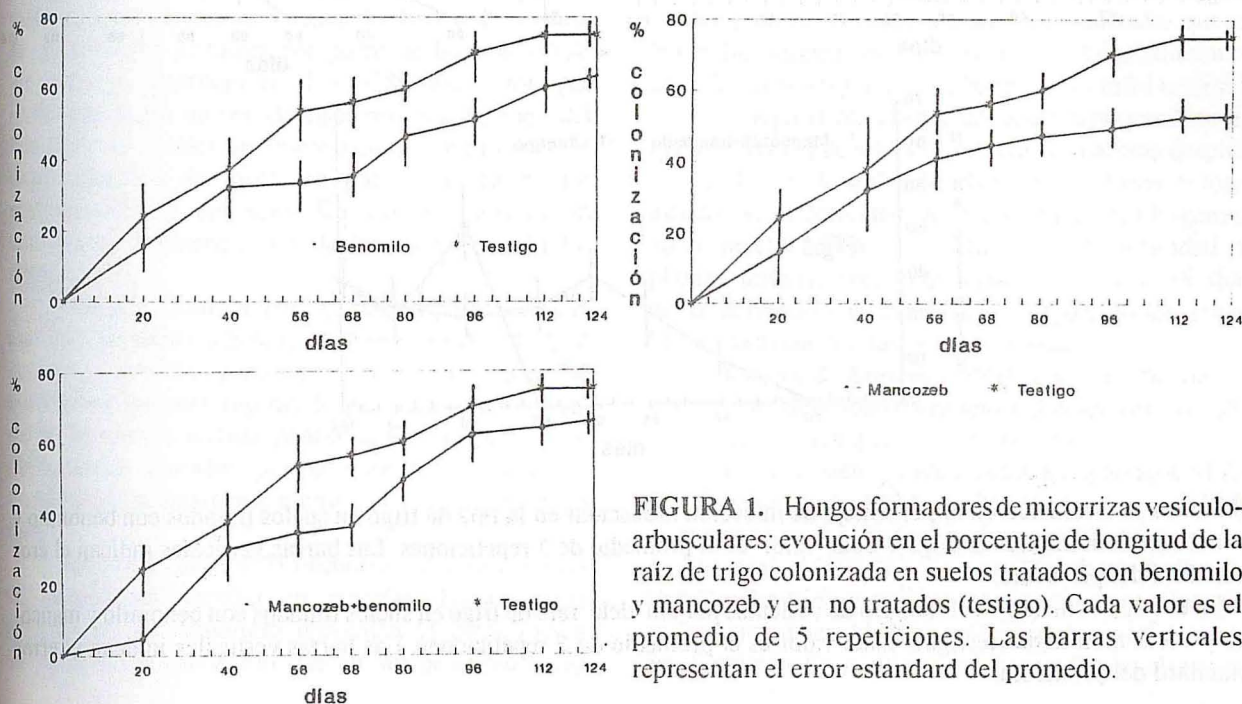


FIGURA 1. Hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares: evolución en el porcentaje de longitud de la raíz de trigo colonizada en suelos tratados con benomilo y mancozeb y en no tratados (testigo). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones. Las barras verticales representan el error estandar del promedio.

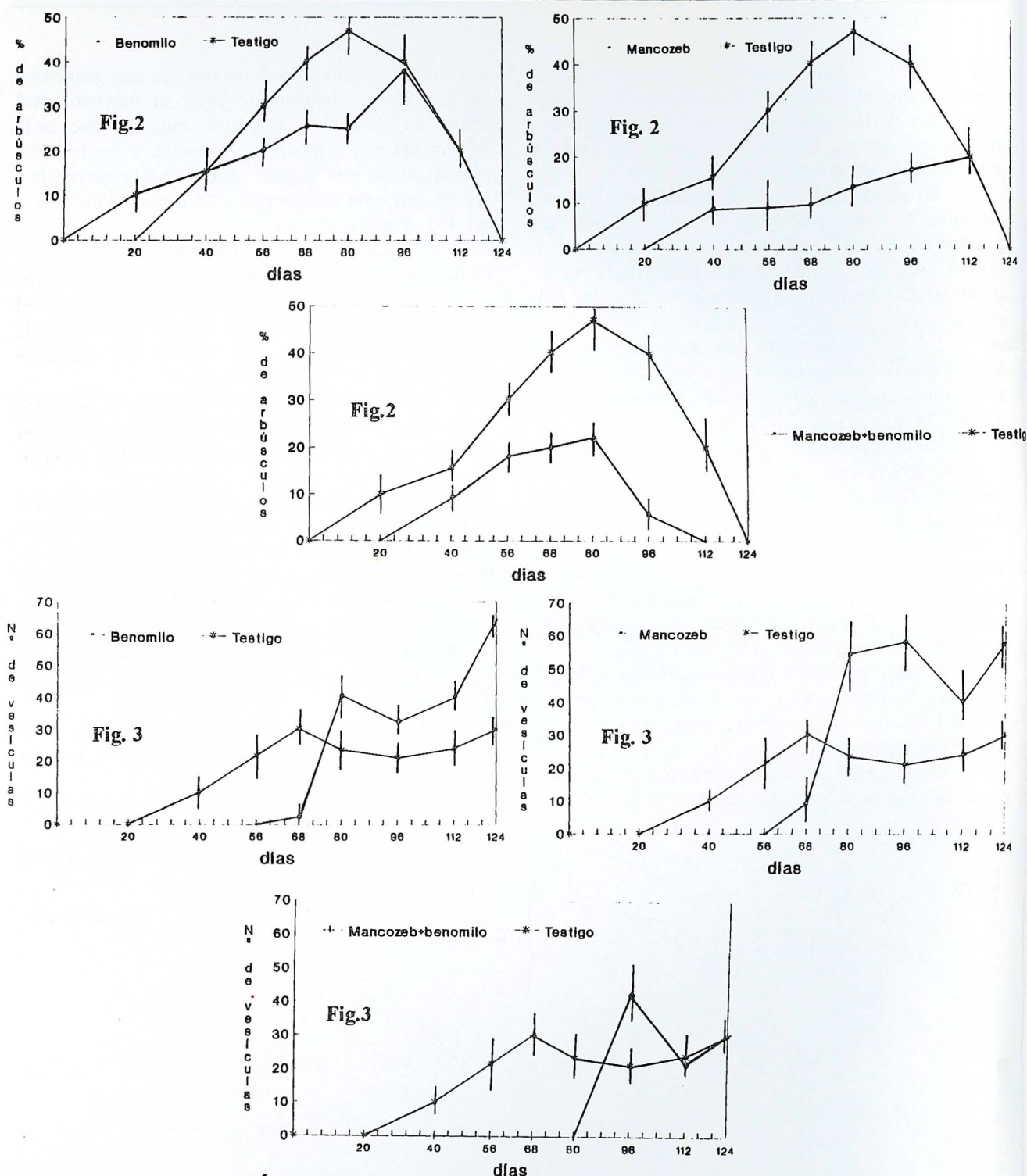


FIGURA 2. Evolución en el porcentaje de infección arbuscular en la raíz de trigo en suelos tratados con benomilo y mancozeb y no tratado (testigo). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones. Las barras verticales indican el error estandard del promedio.

FIGURA 3. Evolución en el número de vesículas por cm de la raíz de trigo en suelos tratados con benomilo y mancozeb y suelo no tratado (testigo). Cada valor es el promedio de 5 repeticiones. Las barras verticales indican el error estandard del promedio.

TABLA 1

Número de esporas en 50 g de suelo rizosférico. (Cada valor es promedio de 5 repeticiones)

Edad de las Plantas (en días)	Tratamientos			
	<i>Benomilo</i>	<i>Mancozeb</i>	<i>Benomilo+ Mancozeb</i>	<i>Testigo</i>
20	40±4,6	45±4,5	40±3,9	40±3,9
40	38±3,9	40±5,8	50±5	39±3,3
56	50±4,8	40±7,3	40±7,2	60±8,9
68	50±5,9	40±8,9	52±5,7	58±8
80	45±7,9	39±9,2	53±8,9	60±10,2
96	43±8,5	39±10	60±10	62±11,1
112	58±7,8	50±5,8	60±8,9	65±10,2
124	60±8,9	67±9,2	68±10	70±11,2

DISCUSION

El benomilo es probablemente el fungicida al que más atención se le ha prestado. Menge (1982) realizó una revisión de su acción en relación a otros fungicidas. En 6 estudios analizados, el benomilo redujo la infección MVA en 5 casos. En nuestro estudio, este fungicida afectó la micorrización a partir de los 40 días.

A estas mismas conclusiones arribaron Bayley & Safir, (1978); Fitter & Nichols, (1988); Manjunath & Bagyaraj, (1984) y Plenchette & Perrin (1992), quienes encontraron que una aplicación del benomilo reducía la colonización de raíces por parte de hongos MVA; sin embargo Boatman et al. (1978), observaron que la micorrización no era afectada por la aplicación del benomilo en suelos no esterilizados, sugiriendo la descomposición del producto por la acción de los microorganismos del suelo. En cambio encontraron una severa deficiencia de fósforo en las plantas tratadas.

Jalali & Domsch (1975), por su parte, notaron que este fungicida afectaba el desarrollo de MVA al tratarse la semilla, pero no poseía efecto cuando se pulverizaba la planta, sugiriendo que este efecto inhibitorio en la semilla tratada podría deberse a los residuos del fungicida tomados por la semilla germinante y translocados pasivamente durante el crecimiento de la raíz.

Bertoldi et al. (1977), encontraron que en plantas de cebolla que crecían en macetas, las sucesivas aplicaciones del benomilo prevenían la colonización de las raíces. Encontraron que en un principio había

formación de arbusculos y vesículas pero que pronto eran inhibidas. Inmediatamente al cesar las aplicaciones del benomilo las raíces eran colonizadas.

Hale & Sanders, (1982) probaron la aplicación de benomilo en macetas a los 39 días de sembradas las plantas de trébol rojo. Encontraron que en las plantas tratadas el porcentaje de infección decayó en un 38 % a los 6 días posteriores a la aplicación del fungicida y en un 13 % a los 13 días. Notaron que mientras que en las plantas no tratadas el porcentaje de colonización aumentaba, éste permanecía estático en las plantas tratadas. Observaron, además, que el benomilo causaba colapsos anormales en los arbusculos y malformaciones y degeneraciones en las hifas internas.

Kough et al., (1987) no observaron cambios en la colonización de raíces de cebolla en macetas después de los 3 días de aplicado el benomilo. Estos autores estudiaron la actividad de la succinato dehidrogenasa en el micelio MVA y encontraron menor actividad en plantas tratadas con fungicidas. A los 14 y 28 días de la aplicación la cantidad y proporción de raíces MVA decrecía en las plantas tratadas.

Rhodes & Larsen, (1981) encontraron que 2 aplicaciones de benomilo a campo, redujeron el desarrollo micorrízico en comparación al control.

El mancozeb, tiende a inhibir los hongos MVA o la formación de MVA a altas dosis, pero en dosis normales no parece afectar la micorrización (Sreenivasa & Bagyaraj, 1989). No obstante Plenchette & Perrin, (1992) y Sieverding (1991), encontraron una reducción en los porcentajes de raíces colonizadas cuando usaban este fungicida. En nuestro ensayo, en relación al testigo,

éste mostró efectos nocivos en la colonización de raíces de plantas de trigo al final de la estación de crecimiento.

En la mayoría de los experimentos con MVA, la evaluación de la micorrización se hace al final del desarrollo del hongo en la raíz, lo cual proporciona datos erróneos sobre el efecto de los distintos factores ambientales, manipulados o no, sobre la simbiosis vesículo - arbuscular (Harley & Smith, 1983). No es fácil evaluar los efectos de los fungicidas sobre los elementos responsables de la fisiología del hongo en el interior de la raíz. En nuestros experimentos, si bien mediante la medida de la longitud de la raíz colonizada se observa una acción general de los fungicidas sobre las MVA, es sobre las estructuras fúngicas donde los efectos son más patentes. La aplicación de benomilo y mancozeb produjo una reducción más drástica del porcentaje de arbusculos, los cuales son los órganos más importantes desde el punto de vista fisiológico de la simbiosis ya que es en esta estructura donde se produce el mayor intercambio de nutrientes entre el endófito fúngico y el hospedador (Cox et al., 1975; Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1983).

Asimismo la aplicación de estos 2 fungicidas produjo el retraso en la aparición de las vesículas, cuyo principal papel fisiológico parece ser el almacenamiento de sustancias de reserva (Cooper, 1984).

Sieverding, (1991), en un experimento llevado a cabo en invernadero, encontró que la mezcla de los fungicidas mancozeb y maneb inhibían la producción de esporas de hongos micorrízicos a los 60 días de puestas las estacas de mandioca previamente embebidas en la mezcla durante 15 minutos. Sin embargo al momento de la cosecha final (a los 80 días) no observó diferencias con el control.

En nuestro ensayo el número de esporas en el suelo no fue afectado por ninguno de los tratamientos con fungicidas si lo comparamos con el testigo no tratado. Esto es importante porque este tipo de esporas asegura a las MVA su sobrevivencia en los suelos durante largos períodos de tiempo. Las esporas predominantes fueron las del tipo amarillo vacuoladas (Mosse & Bowen, 1968) correspondientes a la especie

Glomus mosseae y en menor proporción otras especies de *Glomus* aún no identificadas.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados de los diferentes tratamientos puede concluirse:

a) El benomilo y el mancozeb solos o en combinación, a dosis recomendadas y aplicados secuencialmente, afectan parcialmente el progreso de la colonización de las raíces por parte de los endófitos MVA, lo que hace que la infección se mantenga en niveles inferiores cuando se la compara al testigo no tratado.

b) Estos 2 fungicidas disminuyen el porcentaje de infección arbuscular mientras aumentan considerablemente el número de vesículas en los estadios finales de crecimiento de las plantas.

c) Tanto el benomilo como el mancozeb no poseen efectos sobre la producción de esporas (clamidosporas) en el suelo rizosférico, por lo cual la cantidad de propágulos en el suelo no es afectada por su aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las autoridades de la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la U. N. L. P. por la ayuda brindada durante este ensayo: al Ing. Agr. Guillermo Gonzáles Lima por la formulación y aplicación a campo de los fungicidas probados.

Asimismo deseo agradecer al Dr. Juan A. Ocampo de la Estación Experimental del Zaidín, Granada, España; a la Dra. Irma Gamundi, del Centro Regional Universitario de Bariloche, Universidad Nacional del Comahue y a la Dra. Angélica Arrambarri, del Instituto Spegazzini de la U. N. L. P. por sus sugerencias y lectura crítica del manuscrito.

La autora es miembro de la Carrera del Investigador de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (C. I. C.).

REFERENCIAS

- Bailey, J. E. & Safir, G. R. (1978). Effect of benomyl on soybean endomycorrhizae. *Phytopathology* 68 : 1810-1812.
- Bertoldi, M.; Giovannetti, M.; Griselli, M. & Rambelli, A. (1977) Effects of soil applications of benomyl and captan on the growth of onions and the occurrence of endophytic mycorrhizas and rhizosphere microbes. *Ann. Appl. Biol.* 86: 111-115.
- Boatman, N.; Paget, D.; Hayman, D.S & Mosse, B. (1978). Effects of systemic fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizae infection and plant phosphate uptake. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70: 443-450.
- Cooper, K. M. (1984). Physiology of VA mycorrhizal association. En: *VA Mycorrhiza*. Ed. Powell, C.L. & Bagyaraj, D. J. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. pp. 155-186
- Cox, G.; Sanders, F.E.; Tinker, P.B. & Wild, J.A. (1975). Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: *Endomycorrhizas*. (ed. Sanders, F.E. Mosse, B. & Tinker, P.B.) Academic Press. London. pp.297
- Domsch, K.H. (1964). Soil fungicides. *A. Rev. Phytopath.* 2 : 293-320.
- Fitter, A. M. & Nichols, R. (1988). The use of benomyl to control infection by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 110: 201-206.
- Gerdemann, J. W. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizae. En: *The Development and Functions of Roots*. (ed. Torrey, J.G. & Clarkson, D.T). London, Academic Press. pp.575-591
- & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46 : 235-244
- Hale, K.A. & Sanders, F.E. (1982). Effects of benomyl on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of red clover (*Trifolium pratense* L.) and consequences for phosphorous inflow. *Jour. Pl. Nutr.* 5 : 1355-1367.
- Harley, J. L. & Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. London, New York.
- Jalali, B.L. & Domsch, K.H. (1975). Effect of systemic fungitoxicants on the development of endotrophic mycorrhiza. In: *Endomycorrhizas*. (ed. Sanders, F.E.; Mosse, B. & Tinker, P.B.) Academic Press. London. pp.619-629
- Kough, J.L.; Gianinazzi-Pearson, V & Gianinazzi, S. (1987) Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytol.* 106: 707-715
- Manjunath, A. & Bagyaraj, D. J. (1984). Effect of fungicides on mycorrhizal colonization and growth of onion. *Plant Soil* 80: 147-150.
- Menge, J. A. (1982). Effect of soil fumigants and fungicides on vesicular-arbuscular fungi. *Phytopathology* 72 : 1125-1131.
- Mosse, B. & Bowen, G.D. (1968). A key to the recognition of some Endogone spores types. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51 : 469-492.
- & Tinker, P.B. (1980). Effects of mycorrhizas on nutrition of higher plants. *CRC Handbook of nutrition and food*.
- Ocampo, J.A.; Martin, J. & Hayman, D.S. (1980) Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. I. Host and non host plant grown together. *New Phytol.* 84: 27-35.
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Plenchette, C. & Perrin, R. (1992). Evaluation in the greenhouse of the effects of fungicides on the development of mycorrhiza on leek and wheat. *Mycorrhiza* 1 : 59-62.
- Rhodes, L. H. & Larsen, P. D. (1981). Effects of fungicides on mycorrhizal development of creeping bentgrass. *Plant Disease* 65: 145-147.
- Scannerini, S. & Bonfante-Fasolo, P. (1983). Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Can. Jour. Bot.* 61 : 917-943.
- Sieverding, E. (1991). Vesicular arbuscular-mycorrhiza management in tropical agrosystems. *Schriftenreihe der G T Z.* N° 224. pp. 169 - 174.
- Sreenivasa, M. N. & Bagyaraj, D.J. (1989). Use of pesticides for mass production of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum. *Plant Soil* 119 : 127 - 132.
- Trappe, J. M.; Molina, R. & Castellano, M. (1984). Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22 : 331-359.