

## Cuantificación de inóculo de *Thecaphora frezii* y análisis de su dispersión

Vanesa Peralta<sup>1</sup>; Marcelo Isaías Kearney\*<sup>1</sup>

1- Departamento de Biología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

### Palabras clave:

*Thecaphora frezii*,

Kranz,

Tamaño óptimo de muestra,

teliosporas,

maní.

**Resumen.** El carbón del maní es una enfermedad endémica del centro-sur de la provincia de Córdoba que ocasiona pérdidas significativas en lotes productivos. La intensidad de la enfermedad está marcadamente relacionada con el número de teliosporas presentes en el suelo al momento de la siembra. El objetivo de este trabajo fue determinar el número de muestras más adecuado (TOM) para la cuantificación de la densidad de inóculo de *Thecaphora frezii* en suelo, mediante método analítico y método gráfico propuesto por Kranz y el análisis de la dispersión del patógeno. Se efectuó un ensayo en un lote de producción con alta densidad de inóculo de carbón. Se realizó un muestreo en W en cinco sitios y se obtuvieron un total de 200 muestras. La densidad de inóculo se estimó por conteo directo de las teliosporas observadas en microscopio óptico en 40x. Se concluyó que la utilización de los valores más bajos de coeficiente de variación en el método analítico incrementa significativamente el número de muestras. Empleando el método gráfico, el TOM es menor al obtenido mediante el método analítico. Por último, la cantidad de inóculo de carbón del maní presente en un lote cercano a una planta de proceso, es inversamente proporcional a la distancia del mismo a esa fuente.

**Cita sugerida:** Peralta, V., et al. 2018. Cuantificación de inóculo de *Thecaphora frezii* y análisis de su dispersión. Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus 1 (1): 18-26

### Quantifying *Thecaphora frezii* inoculum and analysis of its dispersion

### Keywords:

*Thecaphora frezii*,

Kranz,

Optimum simple size,

teliospores,

peanut.

**Abstract.** Peanut smut is an endemic disease in the center-south of the province of Córdoba that has caused significant losses in productive lots. The intensity of the disease is markedly related to the number of teliospores present in the soil at the time of sowing. The objective of this work was to determine the most adequate number of samples for the quantification of the density of inoculum of *Thecaphora frezii* in soil, by means of analytical method and graphical method proposed by Kranz and the analysis of the dispersion of the pathogen. An assay was carried out in a production batch with high density of carbon inoculum. W was sampled at five sites and a total of 200 samples were obtained. The inoculum density was estimated by direct counting of the teliospores observed in an optical microscope at 40x. It was concluded that the use of the lowest variation coefficient values in the analytical method significantly increases the number of samples. Using the graphical method, the optimum sample size is lower than that obtained by the analytical method. Finally, the amount of inoculum of the smut peanut present in a lot near a processing plant is inversely proportional to the distance of the same to that source.

Recibido: 6 de abril 2018; aceptado: 31 de mayo 2018

\*Autor para correspondencia: Marcelo Isaías Kearney. E-mail: mkearney@ayv.edu.ar. Ruta Nacional 36, Km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Financiamiento: Subsidio SECyT - UNRC.



© 2018 Facultad de Agronomía y Veterinaria - UNRC - ARGENTINA. Obra bajo licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional [http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es\\_AR](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es_AR)

## INTRODUCCIÓN

En Argentina, y en la última década, la provincia de Córdoba es la que posee más del 90 % de la superficie cultivada con maní (*Arachis hypogaea* L.) y la totalidad del procesamiento (Busso *et al.*, 2004; Barberis *et al.*, 2010).

En cuanto a las “Regiones maniseras dentro de Córdoba” La Región Norte contempla los departamentos Tercero Arriba, Río Segundo, General San Martín y Juárez Celman; la Región Centro a los departamentos Río Cuarto y Presidente Roque Sáenz Peña; la Región Sur al departamento General Roca.

En Argentina la producción de maní se vio desplazada geográficamente desde el norte y centro de la región manisera cordobesa hacia los departamentos ubicados más al sur de la misma (Busso *et al.*, 2004; March y Marinelli, 2004b). Si bien su origen tuvo que ver con la concentración de la industria en los departamentos del sur, este desplazamiento se acentuó como consecuencia de las pérdidas causadas por hongos del suelo (Busso *et al.*, 2004; March y Marinelli, 2004a).

Como el maní desarrolla los frutos debajo del suelo, muchos patógenos que sobreviven en el mismo, pueden afectar raíz, ginóforos, frutos (cajas) y semillas. Entre las enfermedades más importantes se señalan al marchitamiento del maní (*Sclerotium rolfsii*), tizón (*Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*), podredumbre parda de la raíz (*Fusarium solani*) y carbón del maní (*T. frezii*) (March y Marinelli, 2004a). De ésta última faltan conocer aspectos vinculados a su epidemiología, siendo algunos de ellos fundamentales para el desarrollo de tácticas de manejo (Marinelli *et al.*, 2010).

Es una enfermedad que incide de manera brusca sobre el rendimiento por afectar directamente el órgano cosechable y produce síntomas en el hospedante como hipertrofia en frutos, y consistencia esponjosa de los mismos. Al abrirlos, una o varias semillas están carbonosas; las semillas que se encuentran afectadas pueden tener pequeñas áreas hipertrofiadas y con decoloración del tegumento o presentar los síntomas en la totalidad de la semilla; debajo de éste tegumento se encuentra una masa carbonosa compuesta por las teliosporas del patógeno solitarias o en glomérulos de hasta ocho esporas (Marinelli y March, 2004).

El carbón, de presentarse por primera vez en Pampayasta, Villa Ascasubi y Ticino (Zona Norte del área manisera de Córdoba, Argentina) en la campaña 1994/95, pasó a manifestarse todos los años, en otros lugares e inclusive a presentar características epidémicas en varios lotes de producción (Marinelli *et al.*, 1995). Para la campaña agrícola 2012/13, se cuantificó para la región centro-norte una prevalencia del 37 % e incidencia del 0,5 al 55 % y para la región sur una prevalencia del 22 % con valores de incidencia que oscilaron entre el 0,05-0,6 % (Marinelli *et al.*, 2010). Un relevamiento realizado en 2015/2016 de lotes pertenecientes a las zonas norte, centro y sur, arrojó una prevalencia de la enfermedad del 100 % con incidencias mayores en los departamentos del norte, donde se registraron pérdidas superiores al 11 % traducido a un valor de 167 millones de pesos. Uno de los lotes donde se cuantificó la mayor incidencia se ubicó en General Cabrera perteneciente al Departamento Juárez Celman con incidencia de 52 % y porcentaje de pérdida de 35 % en la producción de grano. La zona Sur, área de mayor producción de maní, cuenta con los menores valores de índice de severidad e incidencia (0,04 y 1,32 %, respectivamente), y un porcentaje de pérdida de la producción de 0,74 % lo que se traduce en pérdidas de más de 15 millones de pesos (Paredes *et al.*, 2016).

Como este trabajo se vinculó directamente con la cuantificación del inóculo que ocasiona la enfermedad, fue necesario usar el muestreo de suelo para salvar las limitaciones prácticas en la evaluación de un lote comercial, donde es imposible medir la totalidad de las unidades de la población. La precisión y exactitud de una muestra es directamente proporcional al tamaño de la misma, por lo cual determinar un número óptimo de unidades resulta fundamental a la hora de analizar el comportamiento de una enfermedad (Mora Aguilera *et al.*, 2001).

Considerando que para el carbón del maní no hay suficiente información acerca de su epidemiología, como se expresó anteriormente, se propuso como objetivo de este trabajo determinar el Tamaño Óptimo de Muestra de un lote de maní infestado con *Thecaphora frezii* y analizar la contaminación diferencial del suelo con teliosporas según la ubicación de una fuente de inóculo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción del área de estudio

En un lote de producción de 80 ha, ubicado en la proximidad de una planta procesadora de maní en la zona rural de Charras, se efectuó un ensayo para la determinación del número óptimo de muestras para la cuantificación de la densidad de inóculo de *T. frezii*.

El lote (33°00'43"S- 64°03'09"W) tenía un historial productivo de 10 años con el cultivo de maní, con presencia de carbón en las últimas cinco campañas y se hallaba lindero a una planta de procesamiento de maní que aún en la actualidad recibe materia prima (maní con caja) de diversos lotes de la zona, produciéndose todo tipo de manipuleo del producto, como limpieza, secado, descascarado, etc.

Charras es una localidad de la provincia de Córdoba- Argentina, situada en el departamento Juez Celman a una distancia de 35 km al noreste de la ciudad de Río Cuarto. Se ubica en una zona semiárida de producción agrícola, el régimen térmico se caracteriza por tener una temperatura media anual de 16 °C y una amplitud térmica de 14 °C, el período libre de heladas es de 265 días. La pluviometría de la zona es de 800 mm anuales, con una distribución estacional de tipo monzónico, por lo que el invierno es seco. Los suelos son ricos en limo, bien drenados, fértiles y productivos; presentan como desventaja susceptibilidad al "planchado", fenómeno en el que se destruye la estructura superficial del suelo, producto del impacto de las gotas de lluvia sobre el suelo desnudo. La mayoría de los suelos son clase III y IV de acuerdo a la clasificación que hace el USDA por capacidad de uso.

### Procedimiento de muestreo

En el lote bajo estudio se establecieron cinco sitios de muestreos que fueron ubicados según un diseño en W por tratarse de un hongo cuyo hábitat natural es el suelo y por lo tanto se distribuye en forma agregada. Los sitios 1, 2, 4 y 5 se ubicaron a 20 surcos de los laterales y 10 m de las cabeceras, mientras que el sitio 3 se ubicó en el centro del lote.

Sobre cada brazo de estas W se obtuvieron 10 muestras, lo que arrojaría un total de 40 muestras por cada sitio. Cada muestra estuvo conformada por 10

submuestras (sobre 1 m de surco) obtenidas con un sacabocado de 5 cm de diámetro y 10 cm de profundidad. Esto significó que el volumen aproximado de cada submuestra de suelo fue de 62,5 cm<sup>3</sup>, lo que equivale aproximadamente a 81,25 g considerando una densidad de suelo de 1,3 g/cm<sup>3</sup>. Cada muestra fue numerada en forma correlativa en cada sitio (1-1.....1-40;.....4-1.....4-40) y marcada con una estaca.

Las muestras estaban separadas lateralmente entre sí por cinco surcos y longitudinalmente por cinco metros; por lo que cada brazo abarcó aproximadamente 1500m<sup>2</sup>, y cada W ocupó alrededor de 0,7 ha.

### Determinación del tamaño óptimo de muestra (TOM)

*Método analítico.* De acuerdo a la fórmula  $n = S^2 / (x^2 \cdot CV^2)$ , en la cual n es el número óptimo de muestras, x la media de la densidad de inóculo considerando 40 (10 muestras por cada brazo de la W), 20 (5 muestras por cada brazo de la W), y 12 (3 muestras por cada brazo de la W) en cada sitio de muestreo, S<sup>2</sup> la variancia de la densidad inóculo para cada caso. Para cada número de muestras total por sitio (12, 20, 40) se pre-establecieron errores aceptables de 5, 10 y 20 % (CV= 0,05, 0,1 y 0,2) (Campbell y Madden, 1990).

Una vez obtenida la tabla resumen con los resultados, se procedió a la realización del ANAVA, y posteriormente el método de comparación LSD Fisher, y se compararon los diferentes tratamientos (12, 20 y 40 muestras) utilizando un mismo CV y considerando los cinco sitios de muestreo.

*Método gráfico propuesto por Kranz (1988).* Se consideraron diferentes números de muestras (12, 20 y 40) en los distintos sitios de muestreo. Para realizar esta metodología se estimó la media y la desviación estándar de la cantidad de inóculo obtenido. Los datos se graficaron en un gráfico de doble eje "y" en el cual constan los desvíos y las medias, mientras que el tamaño de muestra figura en la abscisa (eje x). De acuerdo a este método, cuando ambas curvas se estabilizan (curva de desvío y curva de media) se toma como tamaño óptimo de la muestra el número correspondiente en la abscisa.

### Determinación de la densidad de inóculo

La cantidad de inóculo por gramo de suelo se estimó por conteo directo de teliosporas observadas a microscopio en 40x, contenidas en microgotas de 2,5  $\mu$ l, obtenidas de una suspensión de 2 g de suelo en 50 ml de agua. Para ello, se procedió a homogeneizar, es decir, romper los terrones y mezclar manualmente las muestras de suelo, las cuales se encontraban en bolsas referenciadas. De cada bolsa, se extrajo una alícuota de 2 g y se le adicionaron 50 ml de agua. Con una pipeta graduada, se tomó de dicha solución, 9 gotas de 2,5  $\mu$ l y mediante observación al microscopio se cuantificaron el número de teliosporas presentes en cada gota. De los valores obtenidos para las 9 gotas, se calculó el promedio y se realizó el pasaje del valor obtenido en número de teliosporas/0,0001 g de suelo (equivalente a 2,5  $\mu$ l) a número de teliosporas/g de suelo.

### Determinación del nivel de inóculo según distancia a la fuente de teliosporas de carbón (planta procesadora de maní).

Para determinar diferencias entre el nivel de inóculo de diferentes sitios de muestreo, según la cercanía de los mismos a la planta procesadora de maní, considerada en éste trabajo como una fuente importan-

te de inóculo, se utilizó la prueba de comparación ANAVA según test LSD Fisher. El lote se dividió en tres con una línea imaginaria; por lo que llamaremos "tratamiento a" al sector más cercano a la planta procesadora de maní, "tratamiento b" al sector intermedio y "tratamiento c" al sector más alejado de la misma. Para cada tratamiento se utilizaron ocho repeticiones, considerando una repetición al promedio del n° de teliosporas/g de suelo de cada uno de los brazos de las W.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación del tamaño óptimo de muestra en distintos sectores del lote, siguiendo un diseño en W mediante el método analítico.

Para cumplir con este objetivo se utilizó el método analítico utilizando ecuaciones matemáticas.

En la siguiente figura constan los valores obtenidos de TOM según diferentes números de muestras utilizadas y coeficientes de variación para el método analítico.

Si bien se observó variación en el TOM a diferentes

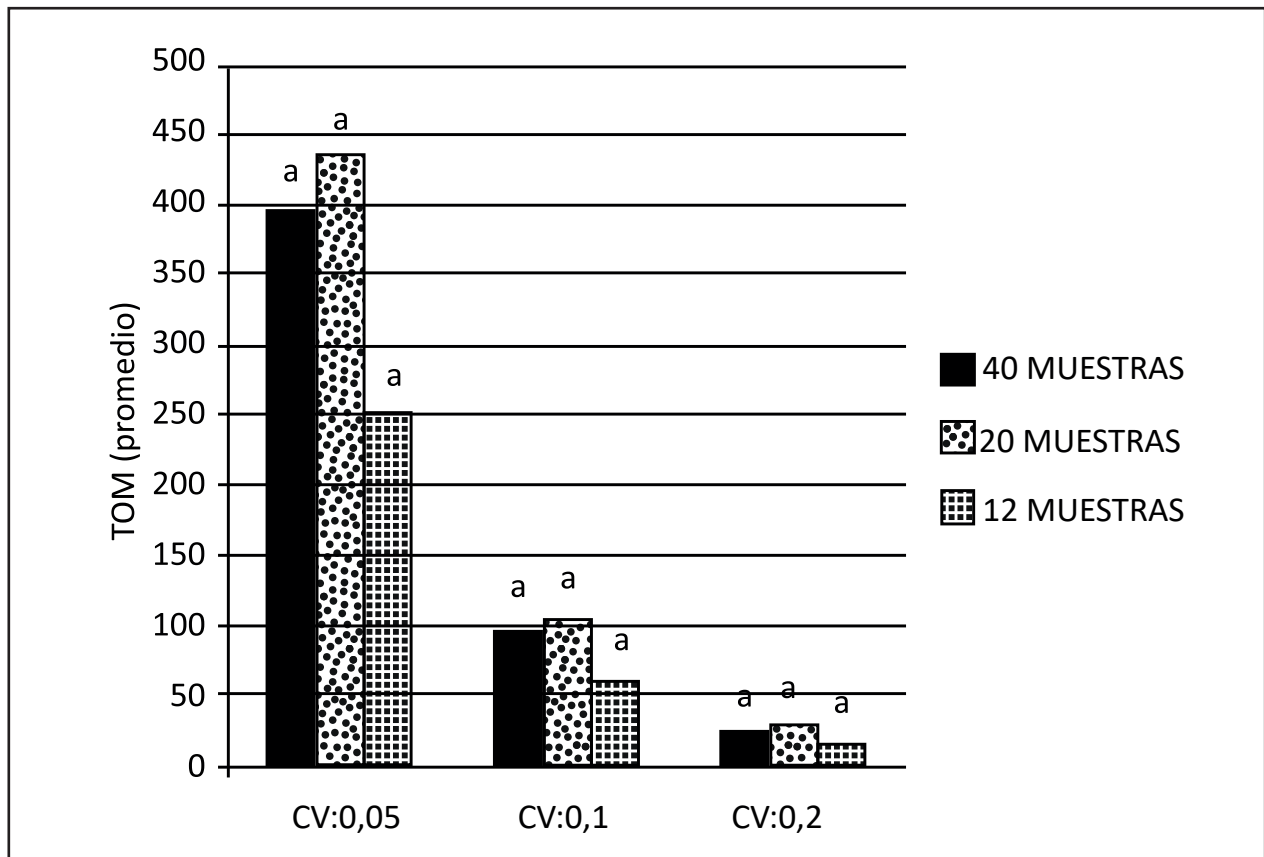


Figura 1. Número promedio de TOM de los cinco sitios de muestreo según diferentes números de muestras tomadas y CV (0,05; 0,1; 0,2).

CV, no se registraron diferencias estadísticamente significativas respecto al número de muestras analizadas (12, 20 y 40) dentro de cada valor seleccionado de CV. Como se puede observar en la figura 1, se visualiza una fuerte tendencia en la disminución de los TOM cuando el CV pasa de 0,05 a 0,2, no así cuando se analizan 40 muestras respecto a las 12 muestras. Estos resultados son de mucha importancia en la práctica, ya que, según la prueba de comparación, es indiferente tomar 250 muestras o 400 muestras, pero cuando hay que llevarlo a la práctica son 150 muestras menos, lo que resulta en menor costo en el muestreo y en la cuantificación de laboratorio. Al respecto, March *et al.* (2009), expresan que la eficiencia del muestreo tiene que ver con el tiempo empleado en la operación a campo y en laboratorio, con el costo que implican los jornales/viáticos, el transporte hacia el lugar de obtención de las muestras, el procesamiento y el uso de alguna técnica específica en laboratorio.

#### **Determinar el tamaño óptimo de muestra en distintos sectores del lote, siguiendo un diseño en W mediante el método gráfico.**

En la figura 2 se pueden observar las representaciones gráficas de los valores de media y desvío estándar de los datos obtenidos a partir de las muestras tomadas en los diferentes sitios de muestreo dentro del lote. Los datos graficados se expresan en teliosporas/g de suelo. Para determinar el TOM se observó a partir de qué número de muestras se estabilizaron las curvas de media y desvío estándar simultáneamente.

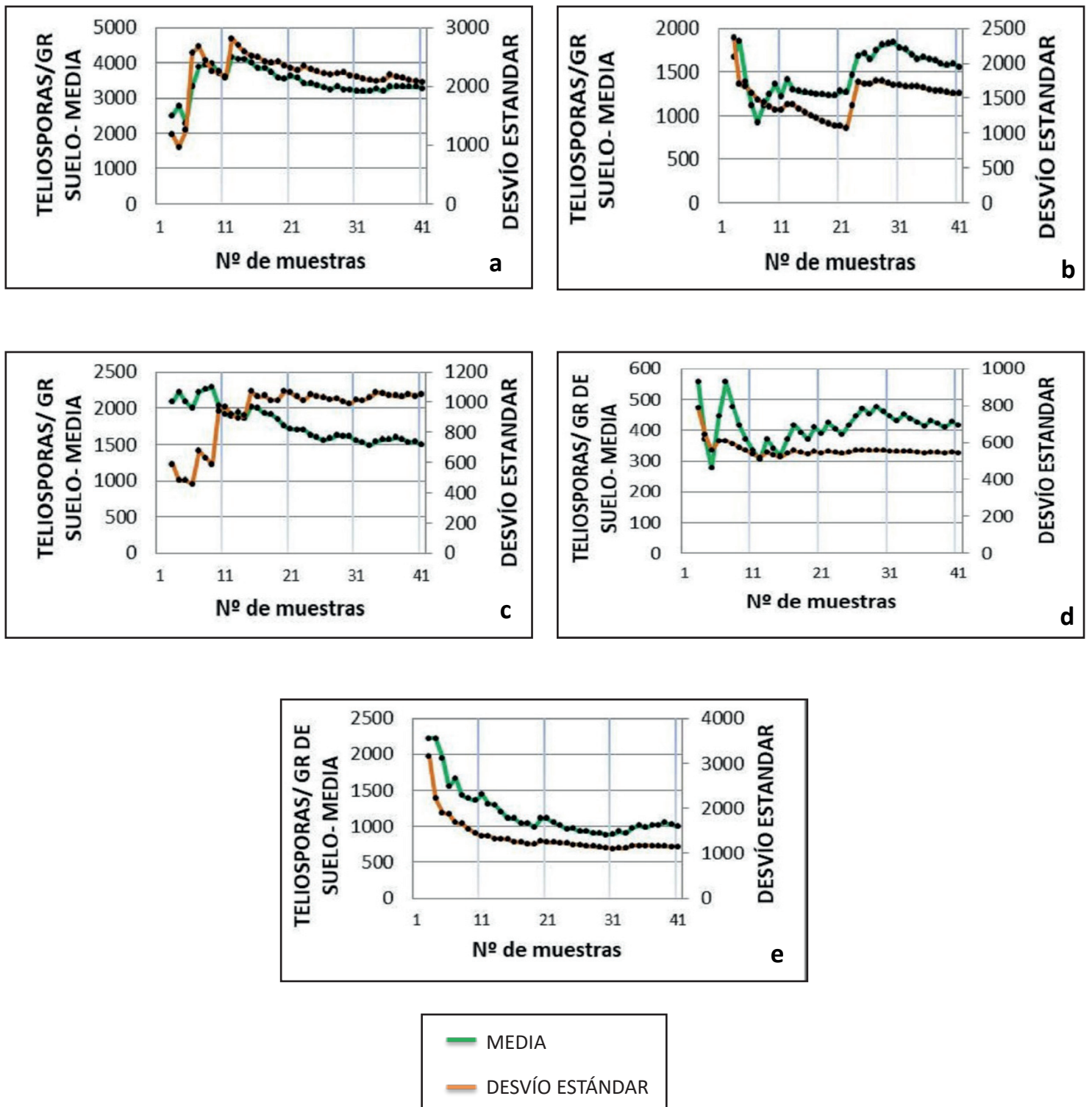
Según se observa en las figuras, en el primer sitio de muestreo el TOM fue de 23 muestras (Figura 2-A). En el sitio N°2 fue de 31 muestras (Figura 2-B). Estas dos localizaciones fueron las más cercanas a la planta procesadora de maní. En el sitio de muestreo N° 3 el TOM fue de 25 muestras (Figura 2-C). Por su

parte, en el sitio de muestreo N° 4 no fue suficiente el número de muestras tomadas (40 muestras) para determinar el TOM, dado que como se observa en el gráfico, las curvas de media y desvío estándar de los datos nunca lograron una estabilidad (Figura 2-D). Este sitio fue el que obtuvo el menor nivel de inóculo (número de teliosporas/g de suelo) dentro de los cinco sitios. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Campbell y Madden (1990), quienes plantean que el método propuesto por Kranz tiene como inconveniente que muchas veces el desvío estándar no logra estabilizarse en el rango de muestras tomadas preliminarmente. Además, estos investigadores plantean que para determinar con precisión y exactitud el número de síntomas causadas por *Erysiphe graminis*, el número mínimo de hojas requeridas aumenta a medida que la media del nivel de enfermedad disminuye y cuando el nivel de precisión deseado aumenta. También afirman que se necesitan muchas muestras cuando la enfermedad se distribuye agregadamente (Campbell y Madden, 1990).

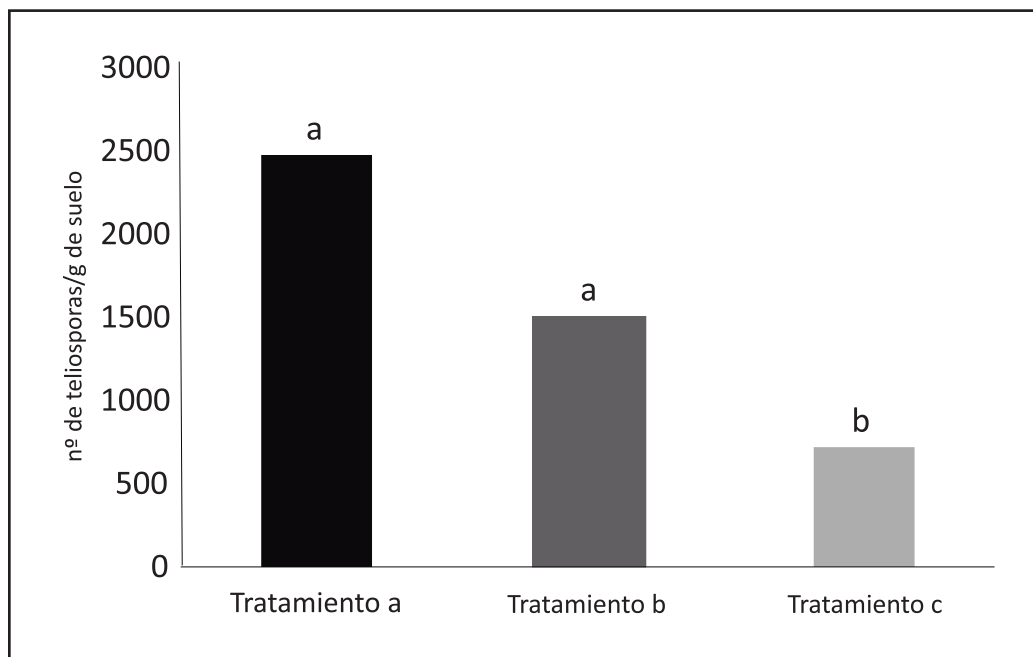
Por último, en el sitio de muestreo N° 5 el TOM fue de 27 muestras (Figura 2-E).

Exceptuando el sitio de muestreo N°4 donde no se pudo obtener un TOM por el método gráfico, en los demás sitios de muestreo se observa una acotada variabilidad en los TOM obtenidos.

Entre los criterios de elección del TOM se encuentran la precisión (CV) y el mínimo costo. De acuerdo a lo anteriormente planteado y a los resultados obtenidos en este trabajo, tomar alrededor de 31 muestras de cada sitio de muestreo sería lo más acertado para determinar la densidad de inóculo de carbón, ya que es el máximo valor de TOM observado. De esta manera se contemplaría a todos los sitios muestreados, y no variarían significativamente los costos.



**Figura 2.** Representaciones gráficas de la media y el desvío estándar del número de teliosporas/g de suelo de cada sitio (A, B, C, D y E).



**Figura 3.** Número de teliosporas/g de suelo teniendo en cuenta tres sectores del lote. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test LSD Fisher.

### Identificar diferencias en los niveles de inóculo según la distancia del sitio muestreado a la fuente de inóculo (planta procesadora de maní).

En la figura 3 se encuentran graficados los valores promedios del número de teliosporas por gramo de suelo tomando distintos sectores del lote. Para el "tratamiento a" (sector cercano a la planta de proceso) se consideró la media de los sitios de muestreo 1 y 2, para el "tratamiento b" (parte media del lote) se tomó la media del sitio 3 y por último para el "tratamiento c" (sector más alejado de la fuente de inóculo) se tomó la media de los sitios de muestreo 4 y 5.

Con la realización de la prueba de comparación ANAVA y posteriormente el test de comparación LSD Fisher, se pudo comprobar que entre los valores promedios de teliosporas por gramo de suelo ubicados más alejados (tratamiento c) y más cercanos a la fuente potencial de inóculo (tratamiento a), existieron diferencias estadísticamente significativas. Por su parte, el tratamiento b, que es el número promedio de teliosporas/g suelo del sitio ubicado en el centro del lote (Sitio 3), mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento c, y no lo hizo

con el tratamiento a. Con éstos resultados podemos inferir que el nivel de inóculo de *T. frezii* disminuye progresivamente a medida que nos alejamos de la planta procesadora de maní (fuente de inóculo de teliosporas). Estos resultados observados concuerdan con lo planteado por March *et al.* (2009), quienes expresan que el aumento de la incidencia de la enfermedad en un cultivo responde a la dispersión del patógeno y se puede relacionar con la distancia a la fuente de inóculo. Por otra parte, Marraro Acuña y Haro (2011), exponen que las esporas de carbón pueden transportarse por el viento, en la semilla e incluso en la maquinaria agrícola, produciendo la dispersión sobre lotes aún no afectados.

## CONCLUSIONES

La utilización del método analítico para determinar el TOM, permite observar que el número de muestras resultantes dependen en mayor medida del coeficiente de variación utilizado y no del número de muestras usado para el cálculo. Además, la utilización de los menores valores de CV en el método analítico incrementó significativamente el número de muestras a evaluar.

En la mayoría de los sitios evaluados y de acuerdo al método gráfico propuesto por Kranz, tomando 31 muestras de suelo como máximo se llegaría a un TOM óptimo para la cuantificación de inóculo de *T. frezii*.

Con respecto a la dispersión del patógeno, se observó que la cantidad de inóculo de carbón del maní presente en un lote cercano a una planta de proceso, es inversamente proporcional a la distancia del mismo a esa fuente.

Si bien estos resultados son conducentes a ciertas afirmaciones con respecto a la cuantificación y dispersión de inóculo de *T. frezii*, sería muy importante continuar este tipo de estudios en otros sitios y bajo diferentes condiciones ambientales.

## BIBLIOGRAFÍA

Barberis, N.A.; Bianchi, E. y Bongiovanni, R.G. 2010. Factores condicionantes para el desarrollo del mercado nacional del maní. Consideraciones estratégicas de marketing a partir de la experiencia internacional. En Actas de 25º Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina. 83-84.

Busso, G.; Civitaresi, M.; Geymonat, A. y Roig R. 2004. Situación socioeconómica de la producción de maní y derivados en la región centro-sur de Córdoba. Córdoba: UNRC, 163 p.

Campbell, C.L. y Madden, L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley and Sons. New York USA, 532 p.

Kranz, J. 1988. Measuring plant disease. En J. Kranz y J. Rotem, editors. Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Springer-Verlag. New York 35-50.

March, G.J. y Marinelli, A. 2004a. Enfermedades del maní en Argentina. 1era ed. Córdoba-Argentina: UNRC, 142 p.

March, G.J. y Marinelli, A. 2004b. Enfermedades y sistema productivo. En March, G.J. y Marinelli, A. editores. Enfermedades del maní en Argentina. 1era ed. UNRC, Córdoba, Argentina. 1-11.

March, G.J.; Marinelli, A. y Oddino, C. 2009. Erradicación. En March, G.J.; Marinelli, A. y Oddino, C. editores. Introducción a la Epidemiología para el Manejo de las Enfermedades de los Cultivos. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina. 23-48.

Marinelli, A. y March, G.J. 2004. Carbón. En Marinelli, A. y March, G.J. editores. Enfermedades del maní en Argentina. 1era ed. UNRC, Córdoba, Argentina. 88-89.

Marinelli, A., March, G.J. y Rago, A. 1995. El carbón del maní *Thecaphora frezii* sobre *Arachis hypogaea* L. En Actas de Resúmenes VII Congreso Argentino de Micología y XVII Jornadas Argentinas de Micología. Rosario, Argentina. 134.

Marinelli, A.; March, G.J.; Oddino, C.; Garcia, J.; Rago, A.; Zuza, M. 2010. El carbón del maní de 1995 a 2010 de enfermedad emergente a enfermedad endémica y epidémica. En Actas de 25º Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina. 28-30.

Marraro Acuña, F. y Haro, R.J. 2011. Carbón del maní (*Thecaphora frezii*): Su incidencia en rotaciones de cultivo. En Actas de 27º Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina. 28.

Mora Aguilera, G.; March, G.; Marinelli, A. y Leonardon, S. 2001. Introducción a la epidemiología y manejo de enfermedades de los vegetales. Curso de posgrado. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC.



Paredes, J.A.; Cazón, L.I.; Osella, M.A.; Peralta, V.; Alcalde, M.; Kearney, M. I.; Zuza, M.; Rago, A. M.; Oddino, C. 2016. Relevamiento regional del carbón del maní y estimaciones de pérdidas producidas por la enfermedad. En Actas de XXI Jornada Nacional de Maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina. 53-54.