

X  
TA423  
C3

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES

CENTRO DE ESTUDIOS FORESTALES Y AMBIENTALES DE POSTGRADO

PROGRAMA: MANEJO DE BOSQUES

**IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE *Cylindrocladium* QUE AFECTA EL PINO**

**CARIBE (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) EN UVERITO, EDO. MONAGAS,**

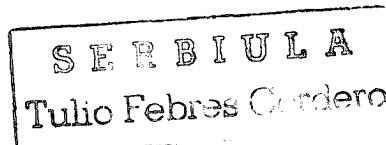
**VENEZUELA, Y SU SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS.**

Trabajo presentado como  
requisito parcial para la obtención  
del grado de Magister Scientiae en  
Manejo de Bosques.

DONACION

PRESENTADO POR :

CHRYSTIAN CARRERO



TUTOR:

LUIS CEDEÑO

Mérida, Abril de 2000

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>Importancia.....</b>	<b>4</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>5</b>
<b>Alcance y Significado.....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>8</b>
<b>REVISIÓN DE LA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>Toma de muestras.....</b>	<b>15</b>
<b>Aislamiento.....</b>	<b>16</b>
<b>Identificación.....</b>	<b>17</b>
<b>Pruebas de patogenicidad.....</b>	<b>18</b>
<b>Pruebas <i>In Vitro</i> de sensibilidad a fungicidas.....</b>	<b>19</b>
<b>Modelo Aditivo Lineal.....</b>	<b>20</b>
<b>Variables a medir.....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>Toma de muestras.....</b>	<b>21</b>
<b>Aislamiento.....</b>	<b>22</b>
<b>Identificación.....</b>	<b>23</b>
<b>Pruebas de patogenicidad.....</b>	<b>26</b>

Pruebas <i>In Vitro</i> de sensibilidad a fungicidas.....	28
Comprobación de hipótesis.....	29
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
Aislamiento e identificación.....	32
Pruebas de Patogenicidad.....	34
Pruebas <i>In Vitro</i> de sensibilidad a fungicidas.....	36
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>48</b>

www.bdigital.ula.ve

## **Resumen**

Los objetivos de esta investigación, fueron identificar el agente causal de quema en las acículas de plántulas de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* en Uverito, Monagas, Venezuela, y evaluar su sensibilidad *In Vitro* a fungicidas. La enfermedad se presenta en plántulas de vivero y comienza a manifestarse como lesiones cloróticas que luego se tornan de color marrón cobrizo y posteriormente marrón claro. El hongo ocasiona, además, pudrición basal. Sobre la base de las características morfométricas de las estructuras asexuales producidas a los siete días en HCA (hojas de clavel – agar), el patógeno se identificó como *Cylindrocladium pteridis* Wolf. La formación de microconidios rectos y curvados y la forma clavada de la vesícula, fueron los parámetros taxonómicos principalmente considerados para la identificación de la especie. La inhibición del crecimiento y de la esporulación *In Vitro* fueron las variables de sensibilidad estudiadas. Benomil, Mancozeb y Carboximida demostraron ser los productos más eficientes en la inhibición del desarrollo del hongo.

## **Abstract**

The objectives of this research were to identify the causal agent of needle blight on *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* seedlings in Uverito, Monagas, Venezuela, and to evaluate its sensitivity *In Vitro* to fungicides. The disease affects needles of nursery seedlings which initially show chlorosis that later became cooper-brown colored and then light brown. Besides, the fungus causes seedlings basal rot. Based on the characteristics of the asexual structures produced during seven days on carnation leaf-agar, the microorganism was identified as *Cylindrocladium pteridis* Wolf. Microconidia straight and curved and vesicle morphology were the main taxonomic features considered for the specie identification. Mycelial growth and sporulation inhibition were the variables measured in the tests of sensitivity to fungicides. Benomyl, Mancozeb and Carboximide were the most effective substances that inhibited the fungus development.

## INTRODUCCIÓN

### Importancia del problema

El crecimiento y desarrollo de una planta bajo condiciones naturales o en plantaciones, es el resultado de la interacción entre una serie de factores genéticos y ambientales, siendo estos últimos los que modifican en mayor o menor grado el potencial de la respuesta fenotípica. Entre los factores ambientales se incluyen los patógenos, los cuales pueden llegar a alterar las características morfológicas o los procesos fisiológicos a niveles económicamente importantes (Agrios, 1973).

En Venezuela, durante las últimas décadas, se ha registrado un importante incremento de la superficie plantada con especies forestales destinadas a la producción de pulpa para papel, particularmente la utilizada con pino caribe en los estados Monagas y Anzoátegui y, con eucalipto en Portuguesa (Márquez, *et al.*, 1994; Sharma y Mohanan, 1982).

En pino caribe, la importancia económica de los daños es atribuible principalmente a enfermedades causadas fundamentalmente por hongos y bacterias. Al respecto, resulta ineludible mencionar los daños provocados por especies pertenecientes a los géneros de hongos *Mycosphaerella*, *Sphaeropsis*, *Cylindrocladium*, *Coleosporium* y *Fusarium* (Ivory, 1994; Mohali, 1996). Sobre los árboles corrientemente medra una gran cantidad de especies patógenas, las cuales ocasionan daños importantes, traducidos en disminución de las tasas de crecimiento, así como de la calidad y cantidad de la pulpa a cosechar (Holmquist, 1990).

Pérdidas económicas derivadas de la mortalidad de árboles, disminución de los rendimientos y calidad del producto comercial, han sido reportadas en pino caribe en

Venezuela (Holmquist, 1990). Estas pérdidas fueron atribuidas a hongos patógenos. Por lo anterior, se hace necesario realizar estudios que permitan suministrar la información necesaria para aplicar medidas que conduzcan a evitar futuras pérdidas, entre estas destacan, estudios sobre los agentes causantes de enfermedad y de prácticas de control, los cuales son fundamentales para establecer el combate apropiado de una enfermedad.

La información relacionada con la ocurrencia e importancia de *Cylindrocladium* spp. en numerosos hospederos es abundante (Crous, Phillips y Wingfield, 1993). Sin embargo, en Venezuela son pocos los estudios que han sido realizados con estos patógenos y, más aún, en especies forestales.

#### Justificación de la Investigación

Durante inspección sanitaria realizada en Julio de 1998 en bancales de viveros y rodales de pino caribe en Uverito, estado Monagas, se detectaron anomalías en acículas y raíces. Los síntomas observados se apreciaron similares a los descritos en enfermedades causadas por especies del género *Cylindrocladium*. A nivel de laboratorio, en los materiales colectados se observaron estructuras reproductivas con las características del género en referencia, lo cual hizo germinar la idea de desarrollar un estudio que contribuyera al conocimiento de las especies de este género que están asociadas con el pino caribe en Venezuela y, sobre las posibilidades de control que pudieran implementarse.

La enfermedad es importante porque quema las acículas, destruye las raíces (Crous y Wingfield, 1994); y además, predispone a la planta a infecciones causadas por otros agentes patógenos convirtiéndolas en sanitariamente inapropiadas para el transplante.

Varias especies de *Cylindrocladium* (*C. pteridis*, *C. floridanum*, *C. scoparium*, *C. clavatum*, *C. colhounii* var. *colhounii*) y *Cylindrocladiella* han sido reportadas como patógenos, en especies del género *Pinus* (Crous, Wingfield y Alfenas, 1993; Crous y Wingfield, 1993, 1994; CAB International, 1993; Rattan, *et al.*, 1983; Kuhlman, *et al.*, 1980; Hunter y Barnett, 1978; Hodges y Cardoso, 1972). Las que más comúnmente han sido asociadas con enfermedades en pino caribe son *C. pteridis* y *C. clavatum* (Crous, Wingfield y Alfenas, 1993; Crows y Wingfield, 1993; Hodges y Cardoso, 1972). Por otra parte, Hunter y Barnett (1978), señalaron que tanto plántulas como individuos adultos de coníferas, son vulnerables a *C. floridanum*, *C. scoparium* y *C. crotalariae* (designado a partir de 1993 como *C. parasiticum* por Crous, Wingfield y Alfenas, 1993).

La identificación correcta de la especie de *Cylindrocladium* que afecta el pino caribe en el estado Monagas, fue importante para el desarrollo del conocimiento que permitió entender el comportamiento del patógeno, las condiciones climáticas y la relación hospedante-patógeno-clima, a los fines de inferir en posibles prácticas de control que conduzcan a la reducción de los niveles de la enfermedad.

### **Significado y Alcance**

En Venezuela el género *Cylindrocladium* ha sido poco estudiado, especialmente en pino caribe, cuya superficie de siembra se encuentra en franco aumento y sobrepasando actualmente las 500.000 hectáreas en la región oriental del país (Márquez, *et al.*, 1994; Holmquist, 1990). La explotación de pino caribe proporciona ocupación a un número

importante de personas en el estado Monagas y, además, suministra materia prima para la industria.

El presente estudio permitió identificar la especie de *Cylindrocladium* que está afectando las plantaciones en el área de estudio; como también, la selección de los productos químicos que pudieran ser utilizados, de ser necesario, para el control de enfermedades causadas por hongos del mismo género, presentes en las plantaciones de la empresa CVG-PROFORCA, ubicadas en Uverito, Edo. Monagas, Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

## **OBJETIVOS**

### **Generales:**

- 1.- Identificar la especie del género *Cylindrocladium* que afecta al pino caribe.
- 2.- Evaluar la sensibilidad de la especie de *Cylindrocladium* que afecta al pino caribe a la acción de ocho productos químicos.

### **Específicos:**

- 1.- Evaluar la capacidad de esporulación bajo el efecto de los productos químicos.
- 2.- Determinar la tasa de crecimiento bajo el efecto de los productos químicos.

## **HIPOTESIS**

- 1 . - Las plantas de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) establecidas en Uverito, estado Monagas, presentan daños causados por un hongo del género *Cylindrocladium*.
- 2.- La especie de *Cylindrocladium* que afecta al pino caribe es sensible a la acción de por lo menos uno de los productos químicos evaluados.

## REVISION DE LA LITERATURA

El género *Cylindrocladium* fue establecido en 1892 por Morgan, para describir un hongo con características morfológicas similares a las observadas en *Penicillium*, principalmente en cuanto a la longitud y la conformación de las ramas de los conidióforos. (Chang, 1993; Morgan, 1892).

Los reportes sobre patogenicidad de especies de *Cylindrocladium* en eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) y diferentes especies de coníferas son numerosos (El-Gholl, Alfieri y Barnard, 1993 ; Crous, Phillips y Wingfield, 1993; Rattan, Dhanda y Randhawa, 1983; Sharma y Mohanan, 1982; Alfenas, *et al.*, 1979 ; Hodges y Cardosos, 1972 ; Sobers, 1968).

Sin embargo, es en eucalipto donde se han realizado la mayor cantidad de estudios detallados sobre especies de este género.

El género *Cylindrocladium* es ampliamente conocido e incluye una gran variedad de especies, las cuales son patógenas en un número importante de hospedantes. Según la monografía de Crous y Wingfield (1994), hasta ahora se han reconocido 22 especies y una variedad de *Cylindrocladium* (*C. avesculatum*, *C. candelabrum*, *C. citri*, *C. clavatum*, *C. colhounii*, *C. curvatum*, *C. floridanum*, *C. gracile*, *C. hawksworthii*, *C. heptaseptatum*, *C. ilicicola*, *C. naviculatum*, *C. ovatum*, *C. parasiticum*, *C. pteridis*, *C. quinqueseptatum*, *C. reteaudii*, *C. scoparium*, *C. spathiphylli*, *C. spathulatum*, *C. theae*, *C. variabile* y *C. colhounii* var. *macroconidialis*).

Crous, Phillips y Wingfield (1993), señalaron que el desarrollo de las enfermedades causadas por *Cylindrocladium* spp. son importantes en las regiones tropicales y subtropicales, siendo más prevalentes bajo condiciones de alta humedad.

Entre las especies de *Cylindrocladium* de importancia patógena en *Pinus caribaea* var. *hondurensis* y eucaliptos, se han mencionado *C. ovatum*, la cual fue descrita por El-Gholl, Alfieri y Crous (1993) en estudios realizados en *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis*, *E. robusta*, *E. tereticornis* y *E. torelliana*, con problemas de manchas foliares. Es importante señalar que *E. urophylla* es la especie de eucalipto más plantada en el estado Portuguesa por la empresa Smurfit Cartón de Venezuela. Actualmente, la empresa CVG-PROFORCA establece rodales de esta especie de eucalipto en el oriente de Venezuela.

*C. pteridis* fue descrito por primera vez en 1926 por Wolf, en helechos (*Polystichum adiantiforme*) con manchas foliares de color marrón. Según Sobers (1968), los reportes sobre este hongo son relativamente raros; sin embargo, ha sido reportado atacando *P. caribaea* var. *hondurensis* y *P. oocarpa* en África, *Cocos nucifera* en India, *Washingtonia robusta* en EE.UU (Florida) y *P. caribaea* y *Pinus* sp. en Brasil (Crous y Wingfield, 1994).

*C. pteridis* fue reportado como patógeno en hojas de *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. robusta*, *E. rufa*, *E. saligna*, *E. tereticornis* y *Pinus* sp., en estudio morfológico y de rango de hospedantes realizado por Sobers (1968), el cual también permitió incluir a *C. macrosporum* como sinónimo de *C. pteridis*.

*C. clavatum* es otra de las especies reportada mundialmente como agente causal de enfermedades en *P. caribaea* var *hondurensis* y otros hospedantes (Rattan, Dhanda y Randhawa, 1983). El-Gholl, Alfieri y Barnard (1993), describieron la especie y realizaron estudios de patogenicidad y de inducción del estado teleomórfico. En ensayos con *Eucalyptus viminalis* El-Gholl, Alfieri y Barnard (1993), observaron síntomas de la enfermedad dos semanas después de la inoculación. En investigación realizada por Crous,

Phillips y Wingfield (1993), *C. clavatum* fue más agresivo que *C. colhounii* y *C. scoparium* cuando se inocularon en *E. grandis*, *Medicago truncatula*, *Arachis hipogaea*, *Glycine max*, *Pisum sativum* y *Solanum tuberosum*.

*C. clavatum* fue reportado por primera vez en pino y eucaliptos por Hodges y Cardoso (1972), y en guisantes por Lopes y Reifschneider (1982). Estos últimos investigadores opinaron que el patógeno es nativo de Brasil. En pruebas de patogenicidad con *C. clavatum* realizadas por Bolkan, Tierney y Tierney (1981), observaron podredumbre radical en papa, maní, eucalipto, soya y pimentón.

Kuhlman, Cordell y Filer (1980), reportaron en *Pinus strobus*, *P. resinosa*, *Picea mariana*, *Abies fraseri*, *Juglans nigra* y *Liriodendron tulipifera* la presencia de una mortalidad ampliamente diseminada en el Este de los Estados Unidos que fue atribuida a *C. scoparium*.

*C. scoparium* fue la primera especie de *Cylindrocladium* descrita (Morgan, 1892) y actualmente es considerada patógeno de numerosas especies de importancia económica (Lyons, *et al.*, 1997). Gorbitz (1970), señaló la presencia de *C. scoparium* en especies de eucaliptos en Costa Rica y Barnard (1984), identificó a *C. scoparium* en Florida causando lesiones cancerosas en el tallo de plántulas de eucaliptos. Alfieri, *et al.* (1972), midieron la patogenicidad de *C. scoparium* en hojas de azalea (*Rhododendron obtusum* Lindl), reportando la aparición de numerosas lesiones a los cuatro días después de inoculadas.

Chang (1993) reportó a *C. floridanum* como una especie nueva para Taiwan, la cual fue capaz de producir el estado teleomórfico en medios artificiales. Sin embargo, este hongo fue descrito por primera vez por Sobers y Seymour (1967) en árboles de pera (*Pirus*

*communis*) en Florida. *C. floridanum* causa enfermedad en las raíces de plántulas de numerosas especies de coníferas y otras especies maderables, lo cual ha resultado en altas tasas de mortalidad en viveros (Dumas, *et al.*, 1998)

Rowe y Beute (1975) aislaron *C. crotalariae* de raíces de maní y observaron amplio rango de virulencia en cepas monoconidiales. Este hongo también fue reportado en Hawaii por Ooka (1982) en plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*) que presentaban retardo en el crecimiento, clorosis y muerte.

Los estudios realizados por Chang (1993), Rowe y Beute (1975), Bolkan, Wilma y Dealmeida (1981), demostraron la amplia gama de acción de las especies del género *Cylindrocladium*, las cuales pueden atacar hojas, tallos, raíces y tubérculos de un número significativo de hospedantes.

Otra de las especies es *C. quinqueseptatum*, la cual se ha reportado causando manchas foliares y tizones en brotes de *E. microcorys* en Australia (Bolland, Tierney y Tierney, 1985).

En la identificación de las especies de *Cylindrocladium* se utilizan, principalmente, las características morfométricas de conidios, vesícula, fiáldes, estipes y ramas de los conidióforos, así como las de crecimiento *In Vitro* (Crous y Wingfield, 1994). En varias especies de *Cylindrocladium*, la identificación también se hace sobre la base del rango de hospedantes y de las características de las estructuras sexuales.

El estado teleomórfico (*Calonectria*) ha sido descrito, pero su distinción no es fácil (Crous y Wingfield, 1994). Algunos estudios con *Cylindrocladium* spp. (Sobers, 1972; Peirally, 1991), mencionan que la morfología de la vesícula es una de las características de

diferenciación taxonómica más importante. Otros investigadores (Hunter y Barnett, 1978) prefieren realizar la identificación en función de las características de los conidios; mientras que, Lopes y Reischneider (1982), realizaron la identificación mediante la combinación de varias cualidades, como las características morfológicas de la cepa, los conidios, los conidióforos y la vesícula. Hunter y Barnett (1978) identificaron especies por las respuestas tróficas y la esporulación en diferentes fuentes de nutrientes y niveles de luz.

Neaubauer y Zinkernagel (1995) lograron la formación de los peritecios de *C. scoparium* a través del apareamiento de cepas sexualmente compatibles; mientras Crous, Wingfield y Alfenas (1993), señalaron que aquellas especies de *Cylindrocladium*, en las cuales no se conoce el estado teleomórfico, son probablemente heterotálicas, sustentando los criterios emitidos por El-Gholl, Schoulties y Alfieri (1983) sobre el homotalismo de *Cylindrocladium theae*.

Estudios genéticos (Crous, Wingfield y Wingfield, 1999), han demostrado similitud entre *C. floridanum* y *C. scoparium*, los cuales han sido incluidos en el complejo *C. candelabrum* donde, probablemente, deben incluirse otras especies aún no identificadas.

*Cylindrocladium* se diferencia de *Cylindrocladiella* porque presenta estípes (filamentos) septados y, conidióforos peniciliados muy ramificados (Crous y Wingfield, 1993).

Algunos estudios de control químico han sido realizados en especies del género *Cylindrocladium*. Barnard (1984) evaluó el control químico de *C. scoparium* con Biertonol, Triademifon, Benomil, Clorotalonil, hidróxido de cobre, Mancozeb y Metiran, consiguiendo el mejor control con Clorotalonil y Benomil. Bolland, Tierney y Tierney (1985), evaluaron

la patogenicidad y el control químico de *C. quinquesporatum* con los productos Benomil, Carboximida, Mancozeb y Oxicloruro de cobre en diez (10) especies de eucaliptos (*E. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. drepanophylla*, *E. grandis*, *E. maculata*, *E. microcoris*, *E. nicholii*, *E. pilularis*, *E. sphaerocarpa* y *E. tessellaris*), determinando que *E. cloeziana* y *E. sphaerocarpa* fueron las más susceptibles. La penetración del hongo se produjo vía estomática, la temperatura óptima para el crecimiento fue 28,5 °C y el mejor control se obtuvo con Mancozeb. Kucharek y Atkins (1993) reportaron la resistencia de algunas cepas de *Cylindrocladium crotalariae* a Benomil e Iptodione.

www.bdigital.ula.ve

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

En el presente estudio se realizaron actividades de campo y de laboratorio. Las primeras estuvieron relacionadas con la toma de muestras de plantas de pino caribe en las plantaciones de Uverito, para el posterior aislamiento de las cepas a identificar y evaluar. Las segundas consistieron en aislar e identificar las especies de *Cylindrocladium* presentes en los tejidos infectados y las pruebas de sensibilidad a productos químicos.

### **Toma de muestras**

Las muestras se colectaron en Julio de 1999 en los bancales de viveros y las plantaciones de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* existentes en Uverito, pertenecientes a la empresa CVG-PROFORCA.

El material colectado fue seleccionado según la presencia de los siguientes síntomas:

- a.- Quema en acículas
- b.- Pudrición en raíces
- c.- Cáncer en el tallo
- d.- Cáncer en las ramas

Las muestras se tomaron de rodales de 2, 4, 8, y 15 años, así como en los bancales de vivero.

A causa de la necesidad de colectar e identificar los daños existentes, el muestreo fue opinático. El material colectado (secciones de ramas, tronco, etc.) se colocó en bolsas plásticas transparentes, las cuales fueron identificadas, selladas y almacenadas en ambiente refrigerado para su posterior transporte al Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes.

En el Laboratorio el material fue registrado y examinado con lupa estereoscópica Marca Zeiss, modelo Stemi SV 11, a fin de detectar la presencia de estructuras (signos) que permitieran inferir sobre los posibles organismos patógenos existentes en el material afectado. Igualmente, parte de los tejidos enfermos se incubaron en condiciones de cámara húmeda, para promover el desarrollo de signos. Previamente el material fue sumergido por 5 minutos en hipoclorito de sodio al 0,5 % para eliminar agentes contaminantes que pudieran interferir las labores de aislamiento e identificación.

### Aislamiento

De las muestras se seleccionaron las que presentaban la sintomatología típica de enfermedades inducidas por especies del género *Cylindrocladium* (quema de acículas, pudrición radical, cáncer en ramas y tallo). El material fue cortado en segmentos de 1 cm x 1 cm, tomado de la interfase tejido sano – tejido enfermo, luego sumergido en solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % por 5 minutos para el caso de raíces y 3 minutos para el resto de los órganos. Después de desinfectado superficialmente fue lavado 3 veces en agua destilada estéril, secado con papel absorbente estéril y cortado en piezas más pequeñas (2 mm x 2 mm), las cuales se sembraron en placas que contenían agua-agar acidificado con

acido láctico (Commonwealth Mycological Institute, 1968). Las placas se incubaron a  $28 \pm 2$  °C y bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz blanca fluorescente. Las colonias emergentes se examinaron en un microscopio fotónico Marca Zeiss, modelo Axioplan MC80, y luego fueron transferidas a medios específicos para hongos del género *Cylindrocladium*, tales como papa-dextrosa-agar (PDA), harina de avena-agar (HAA), glucosa-asparagina-agar (GAA) (Hunter y Barnett, 1978), segmentos de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) (40 g/l) - agar (HCA) (Crous, Phillips y Wingfield, 1993) y leche de clavel (carnation de Nestle) – agar (LCA), con el propósito de estimular la esporulación y registrar las características del crecimiento *In Vitro*.

#### Identificación

La identificación de los cultivos aislados se realizó sobre la base de las características morfométricas de la vesícula, estipe, fiáldes y conidios producidos a los siete días después de la siembra en placas de HCA, incubadas a  $28 \pm 2$  °C y bajo 12 horas de luz blanca fluorescente (Crous, Phillips y Wingfield, 1993; Lopes y Reischneider, 1982; Peirally, 1991; Sobers, 1972).

Los resultados obtenidos se compararon con los registrados en la monografía de Crous y Wingfield (1994) para la identificación a nivel de especie.

## **Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en el invernadero del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes, Santa Rosa, Mérida.

Los organismos aislados se inocularon preliminarmente en el follaje de plantas sanas de pino caribe, con la finalidad de determinar la patogenicidad y poder descartar los agentes contaminantes. De igual manera con los cultivos ubicados en el género *Cylindrocladium* se realizaron pruebas de patogenicidad en suelo estéril, a fin de evaluar la patogenicidad del hongo en la base del tallo y las raíces. Estas pruebas preliminares se condujeron en condiciones similares a las programadas para la inoculación formal, pero, utilizando un número menor de plantas.

Las cepas de *Cylindrocladium* que arrojaron resultados positivos en las pruebas preliminares, se inocularon en plantas sanas de *P. caribaea* var. *hondurensis* de tres (3) meses de edad y con 30 a 35 cm de altura, plantadas en bolsas de polietileno negro de 2 kg de capacidad. La inoculación se efectuó mediante la aspersión de una suspensión conidial preparada con 50 ml de agua destilada estéril por cultivo desarrollado en Leche de Clavel-agar (LCA), durante un mes a 25 °C y 12 horas luz/oscuridad. La concentración conidial utilizada fue 10.700 conidios/ml (El-Gholl, Schubert y Walker, 1997). La cepa evaluada fue un cultivo monoconidial (P1) obtenido de la cepa patrón de *Cylindrocladium* aislada de acículas con síntomas de quema. La inoculación se realizó asperjando la solución conidial con una pistola de bajo volumen, tratando de cubrir toda la planta sin que se produjera escurrimiento. Después de la inoculación, las plantas se colocaron en condiciones de cámara

humeda mediante la colocación de bolsas plásticas transparentes. Dos días mas tarde, se retiraron las cubiertas de plástico y se iniciaron las evaluaciones periódicas para observar el desarrollo de los síntomas. A partir de los materiales inoculados se hicieron reaislamientos para corroborar el cumplimiento de los postulados de Koch (Agrios, 1973) . En total se inocularon 30 plantas con la solución conidial y en 15 plantas (testigos) sólo se aplicó agua destilada estéril. A las 48 horas después de la inoculación y con intervalos de 12 días se iniciaron los registros de patogenicidad, incidencia y severidad (El-Gholl, Alfieri y Barnard, 1993).

#### **Pruebas *In Vitro* de Sensibilidad a fungicidas**

Las pruebas de sensibilidad tuvieron como propósito determinar los productos químicos que inhiben de manera satisfactoria el crecimiento del hongo. Las pruebas se realizaron por dilución de los productos en 20 ml de medio de cultivo [Leche de clavel – agar (LCA)], dispensados en placas de Petri de 9 cm de diámetro. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 15 lbs/pulg<sup>2</sup>. El fungicida correspondiente fue agregado cuando la temperatura del medio había descendido por debajo de los 60 °C, mezclándolo con un agitador Vortex modelo VM-1000 a 500 rpm. Los productos evaluados fueron Benomil (1,25 g/l), Clorotalonil (5 ml/l), Carboximida (5 g/l), Propiconazole (1,25 g/l), Funcloraz (1,5 ml/l), Folpet (5 g/l), Oxicloruro de cobre (5 g/l) y Mancozeb (5 g/l) (Bolland, Tierney y Tierney, 1985; Barnard, 1984). Las placas se incubaron por 5 semanas en condiciones normales de laboratorio (22°C) y bajo un fotoperíodo de 12 de luz/oscuridad, para luego registrar sensibilidad sobre la base de la tasa de crecimiento y la inhibición de la

esporulación. En cada tratamiento se usaron 30 repeticiones. Las placas testigos solo contenían LCA.

El diseño de experimentos fue totalmente aleatorizado con nueve tratamientos (ocho productos químicos y un testigo). Para medir la significancia de los resultados, se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de comparación de medias (Duncan), aplicando el paquete estadístico “Statistic”.

### **Modelo aditivo lineal**

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, t \quad t=9 \quad j = 1, 2, \dots, n \quad n = 30$$

$y_{ij}$  : Observación de la variable respuesta asociada con la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento

$\mu$  : Respuesta de la media general de la población

$\tau_i$  : Efecto asociado con el  $i$ -ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  : Componente de error experimental asociado con la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento

### **Variables estudiadas**

Sensibilidad: Tasa de crecimiento (cm)

Inhibición de la esporulación

## **RESULTADOS**

### **Toma de muestras**

Se colectó el número de muestras que a continuación se especifica:

20 muestras de raíces (5 por edad (2, 4, 8, 15 años))

12 muestras de tallos (3 por edad)

200 muestras de acículas (50 por edad)

20 muestras de raíces (5 por edad)

20 plántulas del vivero con daños en acículas, ramas y raíces

En las muestras colectadas se observaron los siguientes daños:

- Quema de acículas en plantas provenientes de viveros: Necrosis parcial o total, apical, lateral o basal de las acículas. La lesión se inicia como clorosis, luego se torna de color marrón-cobrizo y finalmente marrón-claro. La infección causa necrosis completa de la acícula.
- Pudrición basal en plántulas provenientes de vivero: Lesión localizada a nivel de la interfase tallo-raíz. Se observó necrosis del tejido interno. Las plantas permanecieron erectas, sin síntomas aparentes de marchitez o cualquier otra afección.
- Pudrición de raíces: Estos síntomas se observaron en plántulas y árboles de todas las edades muestreadas. Las lesiones se apreciaron como pudrición y rajaduras en las raíces secundarias, las cuales presentaban color castaño-oscuro en la parte externa. Al realizar un corte longitudinal, el tejido interno se observó necrótico. Las raíces se apreciaron quebradizas.

- Necrosis en la médula del tallo: En arboles de 4, 8 y 15 años con síntomas de decaimiento, se observaron lesiones en la parte mas interna del tallo (médula), pero en la parte externa no se detectó ningún daño.
- Necrosis en nudos de las ramas: En ramas de árboles de 2, 4, 8 y 15 años, se observó necrosis interna del tejido localizado a nivel de los entrenudos. Esta lesión avanzó en ambos sentidos de la rama.
- Quema de acículas en plantación: Se observaron lesiones relacionadas con muerte regresiva de la acicula. El tejido se apreció de color marrón claro y quebradizo. Los daños abarcaron más del 50 % de las acículas.

## Aislamiento

www.bdigital.ula.ve

Los aislamientos obtenidos en las placas con AAA se identificaron a nivel de género, lo cual permitió separar y descartar potenciales agentes contaminantes como *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Aphanocladium* y bacterias. Los hongos de géneros *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Sphaeropsis*, *Lophodermium*, fueron transferidos a PDA, y de estos cultivo se preparó una suspensión de micelio+conidios para ser usada en las pruebas preliminares de patogenicidad, con el propósito de descartar agentes secundarios que pudieran estar interfiriendo con el proceso de aislamiento de los agentes causantes de enfermedad. Las pruebas preliminares permitieron identificar como patógenos del pino caribe a 3 hongos de los géneros *Sphaeropsis*, *Lophodermium* y *Cylindrocladium*.

Los medios de cultivos más favorables para el crecimiento y reproducción del género *Cylindrocladium* fueron los siguientes:

AAA - Para la produccion de clamidosporas, especialmente en cultivos viejos.

PDA - Para crecimiento micelial rápido.

LCA - Para alta producción de inóculo (conidios).

HCA - Para mayor uniformidad en el tamaño de las estructuras reproductivas.

## Identificación

Al cultivar el hongo *Cylindrocladium* en AAA fue evidente la presencia de clamidosporas, las cuales presentaron las siguientes dimensiones:

### Clamidosporas \*\*

Largo	Ancho
Promedio = 18,1625	Promedio = 16,2125
Desviación = 2,73717874	Desviación = 2,99975961
Max. 27	Max. 23,5
Min. 13	Min. 10

\*\* Medidas en AAA con 6 días de crecimiento, 12 h / luz

En cultivos de 7 días en HCA a 25 °C y 12 horas luz/oscuridad las características morfométricas del hongo fueron las siguientes:

### Macroconidios\*

Largo	Ancho
Promedio = 85,36	Promedio = 5,065
Desviación = 4,60	Desviación = 0,20
Max. 96	Max. 5,75
Min. 75	Min. 4,75

\* 1 septo, rara vez 2 ó 3

### Microconidios\*

Largo	Ancho
Promedio = 29,82	Promedio = 2,98
Desviación = 3,95	Desviación = 0,23
Max. 36	Max. 3,5
Min. 20	Min. 2

\* Creciendo en AAA durante 40 días

### Conidióforos

Largo	Ancho

Promedio =	143,20	Promedio =	5,45
Desviación =	18,05	Desviación =	0,50
Max.	165	Max.	6
Min.	106	Min.	5

#### Nº de ramas del conidióforo

Número	
Promedio =	2,375
Max.	3
Min.	2

#### Ramas

Primarias			
Largo	Ancho		
Promedio =	27,13	Promedio =	4,64
Desviación =	3,54	Desviación =	0,48
Max.	32	Max.	5,25
Min.	20	Min.	4

#### Secundarias

Largo	Ancho		
Promedio =	20,12	Promedio =	3,85
Desviación =	4,20	Desviación =	0,28
Max.	26	Max.	4
Min.	12	Min.	3

#### Terciarias

Largo	Ancho		
Promedio =	17,50	Promedio =	3,56
Desviación =	2,38	Desviación =	0,43
Max.	20	Max.	4
Min.	15	Min.	3

#### Fiáldes

Largo	Ancho		
Promedio =	14,16	Promedio =	3,89
Desviación =	1,86	Desviación =	0,28
Max.	19	Max.	4,5
Min.	12	Min.	3,5

#### Estipe

Largo	Ancho		
Promedio =	204,55	Promedio =	4,11
Desviación =	19,52	Desviación =	0,34
Max.	241	Max.	5
Min.	184	Min.	3,75

#### Vesícula

Largo	Ancho		
Promedio =	33,17	Promedio =	4,75
Desviación =	11,06	Desviación =	0,45
Max.	50	Max.	5
Min.	15	Min.	4

Para identificar la especie de *Cylindrocladum* que quema las acículas del pino, se procedió a comparar las dimensiones de las estructuras obtenidas en HCA con las registradas en la descripción de especies conocidas. Las características morfométricas de las estructuras reproductivas asexuales permitieron, a través de la monografía de Crous y Wingfield (1994), identificar a *Cylindrocladum pteridis*, fase conidial de *Calonectria pteridis*, como el agente causal de la enfermedad que quema las acículas del pino caribe en Uverito, estado Monagas.

Los daños observados en los distintos tejidos muestreados estaban relacionados con patógenos pertenecientes a géneros diferentes. La quema de acículas fue el síntoma generado por el ataque de *C. pteridis*. Para el resto de los síntomas, el agente causal también fue identificado y comprobada su patogenicidad de manera preliminar. Se recomienda continuar su estudio por separado.

Entre los agentes causantes de procesos patológicos en pino caribe que se lograron identificar están los siguientes:

<i>Cylindrocladum pteridis</i>	Quema de acículas en plántulas provenientes de viveros.
<i>Cylindrocladum pteridis</i>	Pudrición basal en las plántulas provenientes de vivero.
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Pudrición de raíces.
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Necrosis en la médula del tallo.
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	Necrosis en los nudos de las ramas.
<i>Lophodermium</i> sp.	Quema de acículas a nivel de plantación.

## **Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas. El hongo causó infección en la base, la parte media y la punta de las acículas localizadas en los tercios inferior, medio y superior de las plantas inoculadas, pero, las acículas más afectadas fueron las correspondientes al tercio superior (más jóvenes). Los síntomas se apreciaron similares a los observados en el campo. La enfermedad comenzó a manifestarse como lesiones cloróticas que causaron plasmólisis de los tejidos, los cuales luego se vuelven de color castaño-claro a bronceado y, posteriormente, marrón-claro.

A las 24 horas después de la inoculación, el 60 % de las plantas mostraban acículas con síntomas de la enfermedad, cuya severidad oscilaba entre 10 % y 100 %, prevaleciendo las que tenían menos del 25 % de los tejidos quemados. Los resultados se muestran a continuación:

Porcentaje de Severidad	Porcentaje de acículas afectadas
< 25 % de quema	63,63 %
Entre 25 y 50 %	27,27 %
Entre 50 y 75 %	3,04 %
> de 75 %	6,06 %

En relación a la frecuencia de la parte afectada de la acícula, se observó que el 44,74 % presentaba quema en la punta; el 31,58 % en la parte media y el 23,68 % en la base.

A los 4 y 12 días después de la inoculación, el nivel de incidencia se incrementó 66 y 86,67 %, respectivamente.

Las nuevas acículas producidas no mostraron síntomas de quema y las plantulas usadas como testigos no desarrollaron síntomas de enfermedad durante las observaciones realizadas.

Aunque en las pruebas de patogenicidad preliminares, el hongo produjo pudrición en la base del tallo de plántulas con 10 a 15 cm de altura, éste no daño las raíces ni el tallo de plantas con más de 30 cm de altura.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### **Pruebas *In Vitro* de sensibilidad a fungicidas**

Las pruebas de sensibilidad permitieron medir cualitativa y cuantitativamente la respuesta de *C. pteridis* al tratamiento *IN VITRO* de los fungicidas Benomil, Clorotalonil, Folpet, Oxicloruro de cobre, Mancozeb, Funcloraz, Carboximida y Propiconazole, lográndose diferenciar aquellos a los cuales el patógeno es o no sensible y, los que inhiben o no la esporulación.

A continuación se describen las características cualitativas del crecimiento para cada tratamiento:

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
Funcloraz	A los 15 días se inició el crecimiento micelial en el inóculo exclusivamente y 15 días más tarde el hongo comenzó a invadir el medio. No hubo esporulación.
Benomil	No hubo crecimiento micelial en el lapso de experimentación.
Clorotalonil	Crecimiento activo en el inóculo e invasión del medio desde la primera semana de observación. Crecimiento denso y de color marrón-oscuro, alta producción de conidios desde los primeros 7 días.
Folpet	Crecimiento micelial en el 7 % de las placas (sólo un mes después de la siembra). Micelio aéreo de color marrón-claro, sin esporulación.
Oxicloruro de cobre	Invasión del medio desde la primera semana, crecimiento desuniforme y compacto (formación de costras). Esporulación durante las tres primeras semanas. La cuarta semana sólo formación de protoperitecios.
Mancozeb	No hubo crecimiento.
Carboximida	No hubo crecimiento.
Propiconazole	Crecimiento uniforme y sostenido durante toda la etapa experimental. Micelio marrón-oscuro, adherido al medio. Sin esporulación.
Testigo	Crecimiento uniforme, denso, adherido al medio, color marrón-oscuro, esporulación abundante desde la primera semana. Formación de protoperitecios a partir de la tercera semana.

La evaluacion del crecimiento micelial finalizo a las cinco semanas (35 dias) despues de la siembra, tiempo en el cual el testigo alcanzo el borde de las placas; sin embargo, la evaluación de las características cualitativas se continuó hasta las ocho semanas.

### **Comprobación de hipótesis**

Hipótesis 1: Las plantas de pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) establecidas en Monagas presentan daños causados por un hongo del género *Cylindrocladium*.

Esta hipótesis ha sido comprobada y aceptada, al demostrarse que la quema que afecta las aciculas del pino caribe plantado en Uverito es causada por la especie *Cylindrocladium pteridis*

Hipótesis 2: La especie de *Cylindrocladium* que afecta al pino caribe es sensible a la acción de por lo menos uno de los productos químicos evaluados.

Esta hipótesis ha sido comprobada y aceptada, al demostrarse *IN VITRO* que hubo diferencias significativas (0,5%) (Tabla 1) en el crecimiento micelial y en la esporulación de *C. pteridis* cuando se cultivó en medio de cultivo enmendado con los fungicidas Funcloraz, Benomil, Clorotalonil, Folpet, Oxicloruro de cobre, Mancozeb, Carboximida y Propiconazole.

Tabla 1. Análisis de la varianza para la variable crecimiento (mm) micelial del hongo

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TRATAMIENTO	8	39986.5	4998.31	6036.54	0.0000
REPETICIÓN					
TRATA*REPT	261	216,110	0.82801		
TOTAL	269	40202.6			
GRAN PROMEDIO	1	11004.9			

La prueba de comparación de medias (LSD) de Duncan (Tabla 2), demostró que los fungicidas más efectivos fueron Benomil (0 mm de crecimiento), Carboximida (0 mm), Mancozeb (0 mm), Folpet (0,133 mm) y Funcloraz (0,175 mm), los cuales inhibieron significativamente (con un nivel de confianza de 95 %) el crecimiento micelial de *C. pteridis*.

Tabla 2. Prueba de comparación de medias (mínima diferencia significativa - LSD) para la variable crecimiento (mm) micelial de *C. pteridis*. Valor promedio registrado un mes después de la siembra:

Tratamiento	Promedio	Grupos homogéneos
Testigo	39,500	I
Clorotalonil	10,750	I
Propiconazole	3,600	I
Oxi. de cobre	3,300	I
Funcloraz	0,175	I
Folpet	0,133	I
Mancozeb	0,000	I
Carboximida	0,000	I
Benomil	0,000	I

Valor critico de T	1,969
Valor crítico para comparación	0,4626
Error standard de comparación	0,2349
Nivel de rechazo	0,050 (5%)
Grados de libertad	261

Para efectos prácticos se considera que Benomil, Carboximida y Mancozeb son los mejores productos para combatir a *C. pteridis*, por cuanto durante el lapso de duración del experimento, inhibieron completamente el crecimiento micelial de *C. pteridis*.

Los tratamientos menos eficientes fueron Oxicloruro de cobre (3,3 mm), Propiconazole (3,6 mm) y Clorotalonil (10,75 mm), en los cuales el hongo creció permanente, pero, de forma suprimida al compararlo con el testigo (39,5 mm). Los tratamientos a base de Clorotalonil y Oxicloruro de cobre, se consideran inefectivos porque permitieron el crecimiento micelial y la esporulación del hongo.

## DISCUSIÓN

### Aislamiento e identificación

Los numerosos aislamientos obtenidos en AAA a partir de acículas con síntomas de quema, originaron cultivos fúngicos con características similares. En este medio las colonias mostraron micelio que inicialmente se observó blanco y posteriormente se volvió marrón-rojizo y, además, formaron clamidosporas de (13,0-) 18,2 (-27,0) x (10,0-) 16,2 (-23,5)  $\mu\text{m}$  de diámetro, microconidióforos septados, peniciliados, hialinos con hasta 3 ramificaciones, microconidios hialinos, uniseptados, cilíndro-rectos a curvados con los extremos obtusos y, de (20,0-) 29,8 (-36,0) x (2,0-) 3,0 (-4,0)  $\mu\text{m}$ . En HCA las colonias desarrollaron macroconidióforos hialinos y peniciliados con hasta 3 ramificaciones aseptadas. Las ramas primarias, secundarias y terciarias se observaron hialinas y midieron (20,0-) 27,1 (-32,0) x (4,0-) 4,6 (-5,3) , (12,0-) 20,1 (-26,0) x (3,0-) 3,9 (-4,0) , (15,0-) 17,5 (-20,0) x (3,0-) 3,6 (-4,0)  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Las fiáldes fueron hialinas, aseptadas, reniformes a doliformes y de (12,0-) 14,2 (-19) x (3,5-) 3,9 (-4,5)  $\mu\text{m}$ . Los filamentos (estípes) se observaron hialinos, septados y con (148,0-) 204,6 (-241,0)  $\mu\text{m}$  de longitud. Las vesículas se apreciaron hialinas, aseptadas, clavadas y con (4,0-) 4,8 (-5,0)  $\mu\text{m}$  de grosor. Los macroconidios se mostraron hialinos, con 1-3 septos, cilíndricos con los extremos obtusos y de (75,0-) 84 (-96,0) x (4,8-) 5,1 (-5,8)  $\mu\text{m}$ .

La presencia de macroconidióforos peniciliados y con hasta tres ramificaciones, sugirió inicialmente que el hongo investigado podía pertenecer a los géneros *Cylindrocladium* o *Cylindrocladiella*; sin embargo, la presencia de filamentos septados permitió ubicarlo en *Cylindrocladium* (Morgan, 1892).

Considerando, principalmente, la presencia de los microconidios, la forma de la vesícula y la septación y longitud de los macroconidios, el hongo se identificó como *C. pteridis* Wolf (Wolf, 1926), anamorfo de *Calonectria pteridis* (Crous, Wingfield, y Alfenas, 1993). De las especies descritas en el género *Cylindrocladium*, solo *C. pteridis* y *C. quinquesepatum* desarrollan microconidios, pero los de éste último, tienen una longitud superior a 40 µm y son rectos, mientras que los de *C. pteridis* tienen de longitud inferior a 40 µm y son rectos y curvados. Las especies *C. clavatum*, *C. theae*, *C. avesiculatum*, *C. colhounii* var *colhounii*, *C. colhounii* var. *macroconidialis* y *C. gracile*, presentan vesícula clavada; pero no producen microconidios (Crous y Wingfield, 1994). En 1968, Sobers, señaló no haber encontrado diferencias morfológicas importantes entre los micro y macroconidios de *C. pteridis* y los producidos por los aislamientos del *C. macrosorum* descrito por Sherbakoff (1928), los cuales causan manchas foliares en *Washingtonia robusta*. Debido a ello, Sobers (1968) consideró que *C. pteridis* y *C. macrosorum* son sinónimos. Sin embargo, algunos investigadores (Renard y Quillec, 1979; Renard y Viennot-Bourgin, 1973) continuaron utilizando el binomial *C. macrosorum*. Los microconidios se encontraron principalmente en cultivos viejos, coincidiendo con lo reportado por Sobers (1968). En *P. caribaea* var. *hondurensis* la presencia de *C. pteridis* entraña notable importancia, debido principalmente, a los daños causados por *C. clavatum* en esta especie (Hodges y Cardoso, 1972) y por ser este el primer reporte en Venezuela de *C. pteridis* en pino caribe.

Las estructuras reproductivas asexuales fueron estudiadas morfométricamente en HCA siguiendo la metodología recomendada por Crous, Phillips y Wingfield (1993); sin

embargo, en consideracion a las características observadas y la alta cantidad de conidios producidos en LCA, es posible sugerir que este medio es un excelente substrato para las investigaciones relacionadas con el género *Cylindrocladium*.

Los aislamientos evaluados no desarrollaron el estado teleomórfico en medios de cultivo, lo cual se corresponde con lo señalado por Crous y Wingfield (1994).

Aunque Sobers (1968) menciona que los reportes de *C. pteridis* son relativamente raros, en Venezuela se ha reportado a esta especie causando manchas foliares en *Eucaliptus urophylla* en el estado Portuguesa (Cedeño y Carrero, 2000) y, de esa entidad, se han trasladado eucaliptos hacia Uverito, lo cual pudiera explicar la presencia del hongo en la zona bajo estudio.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

#### Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad permitieron establecer que *C. pteridis* es el agente causal de la enfermedad, por cuanto, el hongo fue reaislado continuamente de los tejidos infectados experimentalmente y, en los cuales, se observaron síntomas similares a los observados en el campo. La enfermedad comenzó a manifestarse como lesiones cloróticas y necróticas de color marrón-cobrizo, que posteriormente se tornan marrón-claro, abarcando parcial o totalmente las acículas localizadas en los tercios inferior, medio y superior de la planta.

Las inoculaciones demostraron la capacidad patógena de *C. pteridis* en las acículas de *P. caribaea* var. *hondurensis*. Los primeros síntomas de la enfermedad se observaron a las 24 horas después de la inoculación. Aunque en las pruebas preliminares ocurrió pudrición

en la base del tallo de plántulas con 10 a 15 cm de altura, plantadas en suelo inoculado con el patógeno, el mismo efecto no fue observado en las raíces ni en la base del tallo de las plantas con más de 30 cm de altura. Esto pudiera estar relacionado con incapacidad del patógeno para infectar los tejidos del tallo después de haberse iniciado el crecimiento secundario. Sin embargo, otras especies de *Cylindrocladium*, tales como *C. scoparium* y *C. floridanum*, causan daños severos en raíces de varios hospedantes cuando la presión de inóculo en el suelo es alta (Dumas, et al., 1998; Burd, Hunter y Hall, 1997; Crous, Phillips y Wingfield, 1993; Kuhlman, Cordel y Filer, 1980; Sobers y Seymour, 1967). *C. clavatum* fue reportado causando este tipo de daño en *P. caribaea* var. *hondurensis* (Hodges y Cardoso, 1972), y de ahí la importancia de establecer medidas para controlar a *C. pteridis* en el suelo y en la parte aérea de la planta, así como de evaluar de los niveles de inóculo en los bancales de los viveros.

Las condiciones ambientales existentes en Uverito estimulan el desarrollo de cuadros patológicos inducidos por *Cylindrocladium pteridis* en pino caribe, particularmente en las plántulas existentes en los viveros, cuyos bancales no son sometidos a desinfección y usualmente se irrigan por aspersión. Las condiciones antes mencionadas y las altas temperaturas, favorecen la infección por este hongo (Watanabe, 1994). Casos parecidos han sido reportados para especies como *C. clavatum* y *C. scoparium*, los cuales bajo condiciones ambientales similares y una alta concentración de inóculo, han causado quema foliar y necrosis radical en especies de pino y de eucalipto (Barnard, 1984).

### **Pruebas *In Vitro* de sensibilidad a fungicidas**

Las pruebas de sensibilidad de *C. pteridis* a fungicidas permitieron demostrar que los productos más eficientes fueron Benomil, Mancozeb y Carboximida (LSD = 0,05), los cuales inhibieron toda actividad del patógeno. Los productos Folpet y Funcloraz demostraron ser inhibidores del crecimiento de *C. pteridis* hasta un mes después de la siembra en medio de cultivo, lapso a partir del cual comenzó a apreciarse crecimiento micelial. Los productos Clorotalonil, Oxicloruro de cobre y Propiconazole tuvieron baja actividad inhibitoria del crecimiento micelial del hongo. Oxicloruro de cobre permitió el desarrollo de protoperitecios y de conidios y, Clorotalonil esporulación abundante a partir de los siete días después de la siembra.

Los resultados obtenidos son comparables a los reportados por Bolland, Tierney y Tierney. (1985), quienes señalaron que Mancozeb fue el más eficiente en controlar la quema de brotes en eucaliptos, causada por *C. quinqueseptatum*. Aunque Bolland, Tierney y Tierney (1985), indicaron que Mancozeb fue más efectivo que Benomil, Carboximida y Oxicloruro de cobre, los resultados del estudio que se reporta, ubican a Mancozeb, Benomil y Carboximida en el mismo nivel de sensibilidad (total inhibición del crecimiento); sin embargo, es importante destacar que el estudio de Bolland, Tierney y Tierney (1985) fue realizado *IN VIVO* con *C. quinqueseptatum*. Tanto en la investigación de Bolland, Tierney y Tierney. (1985) como en la que se reporta Oxicloruro de cobre fue totalmente inefectivo.

El estudio permitió confirmar lo expresado por Kucharek (1992), Bolland, Tierney y Tierney (1985) y Barnard (1984) en cuanto a que Benomil es un excelente inhibidor del crecimiento de especies del género *Cylindrocladium* y/o del desarrollo de las enfermedades

que estas inducen. De los resultados igualmente se deduce que *Cylindrocladium pteridis* es sensible a productos de acción protectiva como Carboximida y Mancozeb, los cuales por ser economicos, se ubican en situación privilegiada para ser aplicados a nivel de campo. Observaciones similares referentes a estos productos protectivos fueron publicadas por Bolland, Tierney y Tierney (1985) y Barnard (1984), quienes lograron disminuir significativamente los daños producidos en eucaliptos por *C. quinqueseptatum* y *C. scoparium*, respectivamente.

Los productos a base de cobre y Clorotalonil son inapropiados para el control de enfermedades causadas por especies del género *Cylindrocladium*, tal como lo demostraron los resultados obtenidos en el presente estudio y los reportados por Bolland, Tierney y Tierney (1985) y Barnard (1984), quienes al evaluar el control químico de enfermedades causadas por *Cylindrocladium* spp. en eucaliptos, encontraron las peores respuestas en los tratamientos a base de Cobre.

Para efectos prácticos, se recomienda realizar ensayos de campo, para evaluar la aplicación en mezcla o en forma alternada de los productos Benomil, Mancozeb y Carboximida, a los fines de evitar la aparición de razas resistentes, situación que ha sido reportada para Benomil por varios investigadores (Whiteside, 1980; McGrath, Staniszewska y Shishkoff, 1996; Ruppel, Jenkins y Burd, 1980)

Según Dumas, *et al.* (1998) y Lyons, *et al.* (1997), la desinfección de los bancales es determinante para la disminución del inóculo inicial e impedir la aparición de enfermedades causadas por especies del género *Cylindrocladium*. La manifestación de la enfermedad a nivel de vivero puede estar relacionada con la alta concentración de inóculo existente en los

bancales. Por ello, para reducir los daños, se sugiere la implementación de medidas de control como la desinfección de los bancales de vivero. Dumas, *et al.* (1998) y Lyons, *et al.* (1997) sustentan esta recomendación al mencionar que mediante la desinfección del substrato consiguieron disminuir los niveles de incidencia de enfermedades causadas por *C. floridanum* y *C. scoparium* en pino blanco (*Picea glauca* Voss) y *Eucaliptus grandis* y *E. robusta*, respectivamente.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CONCLUSIONES

- El estudio permitió identificar a *Cylindrocladium pteridis* como agente causal de quema de acículas en plántulas de pino caribe en Uverito, estado Monagas, Venezuela, siendo esta la primera vez que el país se reporta a este patógeno en *P. caribaea* var. *hondurensis*.
- La enfermedad causada por *C. pteridis* se manifestó como necrosis parcial o total de las porciones apical, media o basal de las acículas. Se inició como clorosis, que luego se tornó de color marrón-cobrizo y posteriormente marrón-claro. La acícula sufrió necrosis generalizada conforme avanzó el daño.
- Las pruebas de sensibilidad permitieron descartar y seleccionar fungicidas que pudieran ser utilizados para el control de *C. pteridis* en pino caribe. Los fungicidas que inhibieron satisfactoriamente el crecimiento del hongo fueron Benomil, Mancozeb y Carboximida. Los fungicidas Funcloraz, Folpet, Propiconazole y, en especial, Oxicloruro de cobre y Clorotalonil, demostraron ser ineficaces en la supresión del crecimiento micelial y la esporulación de *C. pteridis* cultivado *IN VITRO*.
- En el desarrollo del estudio lograron detectarse otros cuadros patológicos, los cuales deben ser estudiados en detalle para evaluar el daño y las pérdidas económicas que ocasionan. En tal sentido, se destaca la importancia de la pudrición de raíces, la necrosis en la médula del tallo y en los nudos de las ramas causada por *Sphaeropsis sapinea* y la quema de acículas en plantación inducida por *Lophodermium* sp.

## BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 1973. Plant pathology. 4<sup>th</sup> ed.. Academic Press. New York. pp. 17-23.

Alfenas, A. C. Matsuoka, K., Ferreira, F. A. e Hodges, C. S. 1979. Identificação, características culturais e patogenicidade de três espécies de *Cylindrocladium* isoladas de manchas de folha de *Eucaliptus* spp. Fitopatol. Bras. 4 : 445-459.

Alfieri, S. A., Linderman, R. G., Morrison, R. H. and Sobers, E. K. 1972. Comparative pathogenicity of *Calonectria theae* and *Cylindrocladium scoparium* to leaves and roots of Azalea. Phytopathology 62 : 647-650.

Barnard, E. L. 1984. Occurrence, impact, and fungal control of girdling stem cankers caused by *Cylindrocladium scoparium* on eucalyptus seedlings in a South Florida nursery. Plant Disease 68 : 471-473.

Bolkan, H. A., Wilma, R. C. and Dealmeida, O. C. 1981. Pathogenicity of *Cylindrocladium clavatum* causing potato tuber rot. Plant Disease 62 : 47-49.

Bolland, L., Tierney, J. W. and Tierney, B. J. 1985. Studies on leaf spot and shoot blight of eucalyptus caused by *Cylindrocladium quinqueseptatum*. Eur. J. For. Path. 15 : 385-397.

Burd, A. D., Hunter, B. B. and Hall, T. J. 1997. Quantitative enumeration of soilborne propagules of the imperfect fungal plant pathogen, *Cylindrocladium scoparium*. *Phytopathology* 87: S117.

Cedeño, L. y Carrero, C. 2000. *Cylindrocladium pteridis* causando manchas foliares en eucaliptos de Portuguesa, Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 44: (en prensa).

CAB International. 1993. IMI-Descriptions of fungi and bacteria. *Mycopathologia* 122: 43-64.

Chang, T. 1993. *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* species new to Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 34 : 357-361.

Commonwealth Mycological Institute. 1968. Plant Pathologist's pocketbook. Second Edition. Kew. Surrey, England. pp. 324-327.

Crous, P. W., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. 1999. The *Cylindrocladium candelabrum* species complex includes four distinct mating populations. *Mycologia* 91 : 286-298.

Crous, P. W. and Wingfield, M. J. 1994. A monograph of *Cylindrocladium* including anamorph of *Calonectria*. *Mycotaxon* 51 : 341-435.

Crous, P. W. and Wingfield, M . J. 1993. A re-evaluation of *Cylindrocladiella*, and comparison with morphologically similar genera. Mycol. Res. 97 : 433-488.

Crous, P. W., Phillips, J. L. and Wingfield, M. J. 1993. New records of *Cylindrocladium* and *Cylindrocladiella* spp. in South Africa. Plant Pathology 42 : 302-305.

Crous, P. W., Wingfield, M. J. and Alfenas, A. C. 1993. Additions to *Calonectria*. Mycotaxon 46 : 217-234.

Dumas, M. T., Greifenhagen, S., Halicki-Hayden G. and Meyer, T. R. 1998. Effect of seedbed steaming on *Cylindrocladium floridanum*, soil microbes and the development of white pine seedlings. Phytoprotection 79 : 35-43.

El-Gholl, N. E., Schubert, T. S. and Walker, S. E. 1997. Expanded range of *Cylindrocladium colhounii* in the United States. Plant Disease 81: 1333.

El-Gholl, N. E., Alfieri, S. A. and Barnard, E.L. 1993. Description and pathogenicity of *Calonectria clavata* sp. nov. Mycotaxon 48 :201-216.

El-Gholl, N. E., Alfieri, S. A. and Crous, P. W. 1993. Description and pathogenicity of *Cylindrocladium ovatum* sp. nov. Can. J. Bot. 71 : 466-470.

El-Gholl, N. E., Schoulties, C. L. and Alfieri, S. A. 1983. Homothallism in *Calonectria theae*. *Mycologia* 75: 162-163.

Gorbitz, A. (Edit) 1970. Manchas foliares causadas por el hongo *Cylindrocladium scoparium* Morg. en *Eucalyptus* spp. en Turrialba, Costa Rica. *Turrialba* 20 : 365-366.

Hodges, C. S. and Cardoso, L. C. 1972. A root disease of Pine, Araucaria, and Eucalyptus in Brazil caused by a new especies of *Cylindrocladium*. *Phytopathology* 62 : 898-901.

Holmquist, O. 1990. El síndrome de muerte súbita del pino caribe. *Celulosa y Papel de Venezuela*, 2: 9-12.

Hunter, B. B. and Barnett, H. L. 1978. Growth and sporulation of species and isolates of *Cylindrocladium* in culture. *Mycologia* 70 : 614-635.

Ivory, M. H. 1994. Records of foliage pathogens of species in tropical countries. *Plant Pathology* 43: 511-518.

Kucharek, T. A. and Atkins, J. 1993. Ocurrence and control of *Cylindrocladium* black rot in peanuts in Florida. *Soil Crop Sci. Soc. Florida Proc.* 52 : 17-20.

Kuhlman, E. G., Cordell, C. E. and Filer, T. H. 1980. *Cylindrocladum* root rots of sweetgum seedlings in southern forest tree nurseries. Plant Disease 64: 1079-1080.

Lopes, C. and Reischneider, F. J. B. 1982. Pathogenicity of *Cylindrocladium clavatum* to pea, a new host, and preliminary evaluation of its virulence. Plant Disease 66 : 951-953.

Lyons, M. T., Hunter, B. B., Bell, T. K., Burd, A. D. and Hall, T. J. 1997. Field application of composts and Basamid, a fumigant, for control of *Cylindrocladium scoparium*. Phytopathology 87: S117.

Márquez, O., Hernández, R., Franco, W. Y. y Visaz, F. 1994. Factores edáficos y estado nutricional de plantaciones de *Pinus caribaea* en relación a la muerte regresiva, en Uverito, estado Monagas. Venesuelos 2: 15-18.

McGrath, M. T., Staniszewska, H., Shishkoff, N. 1996. Fungicide sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* populations in the United States. Plant Disease 80: 697-703.

Mohali, S. R. 1996. First report of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* associated with root disease of Caribbean pine in Venezuela. Plant Disease 80: 959.

Morgan, A. P. 1892. Two new genera of Hyphomycetes. Botanical Gazette 17 :190-192.

Neaubauer, C. and Zinkernagel, V. 1995. *Calonectria morganii*, die hauptfruchform von *Cylindrocladium scoparium*. Journal of Plant Disease and Protection 102 :323-325.

Ooka, J. J. 1982. *Cylindrocladium* root and crown rot of alfalfa in Hawaii. Plant Disease 66 : 947-948.

Peerally, A. 1991. The classification and phytopathology of *Cylindrocladium* species. Mycotaxon 40 :323-366.

Rattan, G. S. Dhanda, R. S. and Randhawa, H. S. 1983. Studies on *Cylindrocladium clavatum* the cause of seedling disease of Eucalyptus hibrid. Indian Forest 109 : 562-565.

Renard, J. L. and Quillec, G. 1979. Diseases and anomalies of oil palm due to *Cylindrocladium macrosporum*. Oleagineux 34: 331-337.

Renard, J. L. and Viennot-Bourgin, G. 1973. A new disease of oil palm due to *Cylindrocladium macrosporum*. Oleagineux 28: 443-445.

Rowe, R. and Beute, M. 1975. Variability in virulence of *Cylindrocladium crotalariae* isolates on peanut. Phytopathology 65 : 422-425.

Ruppel, E. G. Jenkins, A. D. and Burth, L. M. 1980. Persistence of benomil-tolerant strains of *Cercospora beticola* in the absence of benomil. *Phytopathology* 70: 25-26.

Sharma, J. K. and Mohanan, C. 1982. *Cylindrocladium* spp. associated with various diseases of *Eucalyptus* in Kerala. *Eur. J. For. Path.* 12: 129-136.

Sherbakoff, C. D. 1928. *Washingtonia* palm leaf spot due to *Cylindrocladium macrosporum* n. sp. *Phytopathology* 18: 219-225.

Sobers, E. K. 1968. Morphology and host range of *Cylindrocladium pteridis*. *Phytopathology* 58 : 1265-1270.

Sobers, E. K. 1972. Morphology and pathogenicity of *Calonectria floridana*, *Calonectria kyotensis* and *Calonectria uniseptata*. *Phytopathology* 62 : 485-487.

Sobers, E. K. and Seymour, C. P. 1967. *Cylindrocladium floridanum* sp. n. associated with decline of peach trees in florida. *Phytopathology* 57 : 389-393.

Watanabe, T. 1994. *Cylindrocladium tenue* comb. nov. and two other *Cylindrocladium* species isolates from disease seedlings of *Phellodendron amurense* in Japan. *Mycologia* 86: 151-156.

Whiteside, J. O. 1980. Tolerance of *Mycosphaerella citri* to benomil in Florida citrus groves. Plant Disease 64: 300-302.

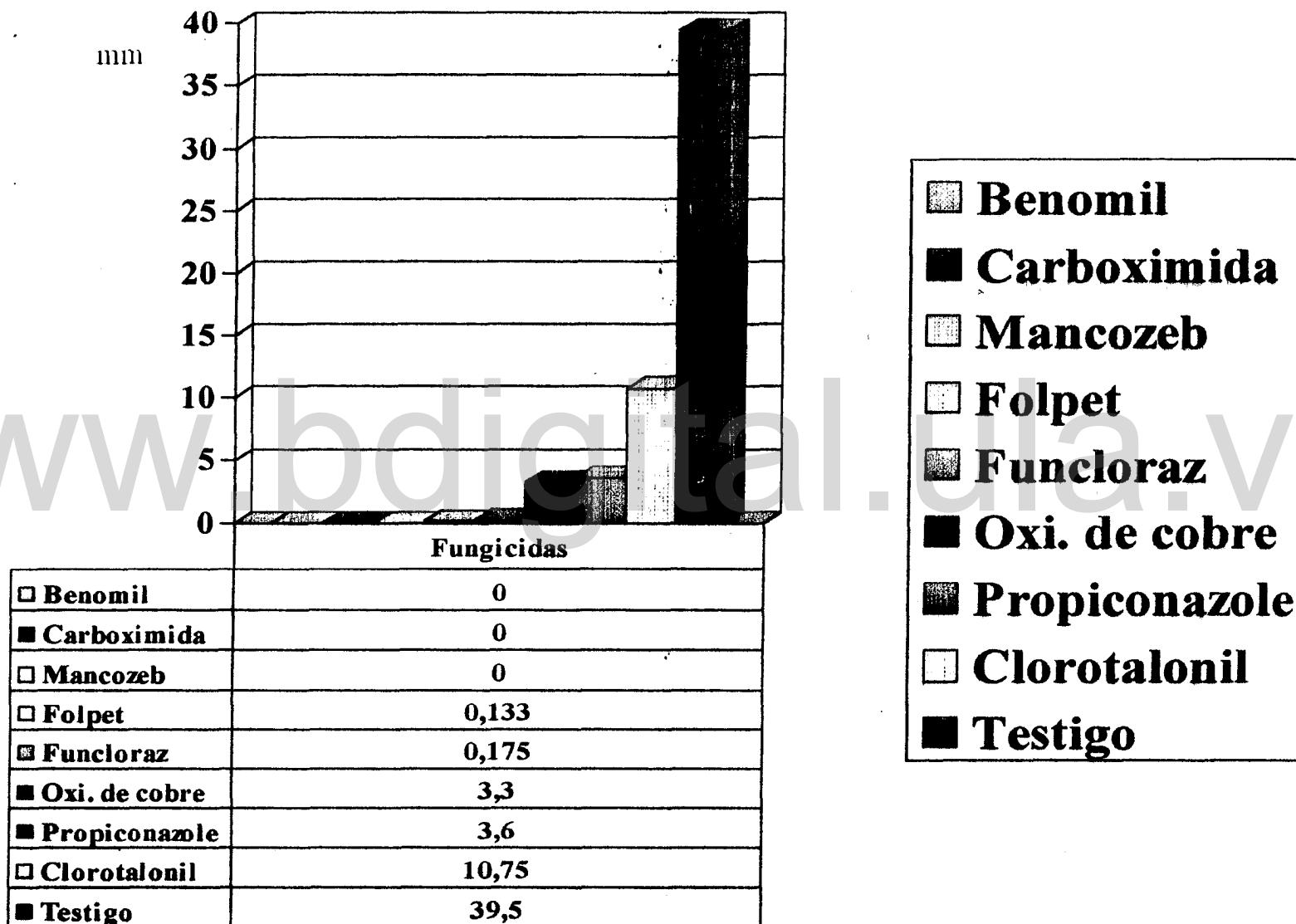
Wolf, F. A. 1926. Brown leaf spot of leather leaf fern. J. Elisha Mitchael Sci. Soc. 42: 55-62.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**ANEXOS**

## Gráfico y tabla de crecimiento micelial (mm) de *Cylindrocladium pteridis* al mes después de la siembra en los tratamientos fungicidas



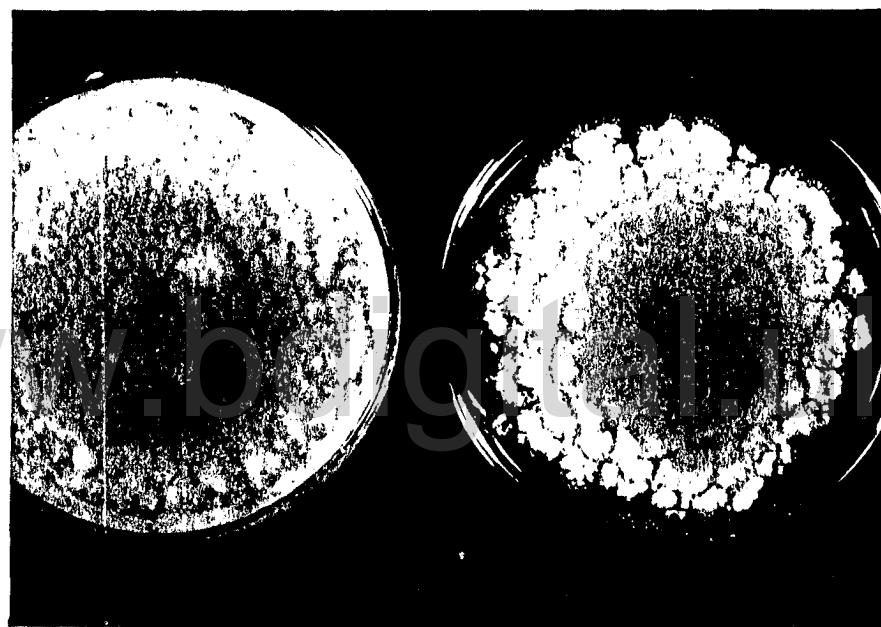
# Esporulación *in vitro* de *Cylindrocladium pteridis* en los distintos tratamientos fungicidas

<u>Fungicidas</u>	<u>Esporulación</u>
Benomil	N
Carboximida	N
Mancozeb	N
Folpet	N
Funcloraz	N
Oxi. de cobre	P
Propiconazole	N
Clorotalonil	P
Testigo	P



www.bdvirtual.ula.ve

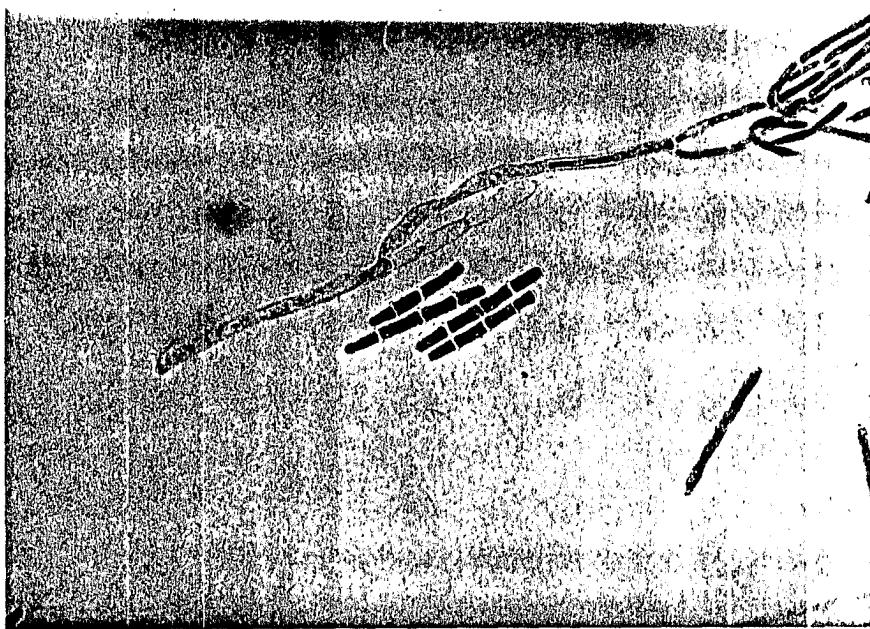
Plántula de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* proveniente de bancales de viveros de Uverito, Estado Monagas, con síntomas de quema en las acículas causada por *C. pteridis*.



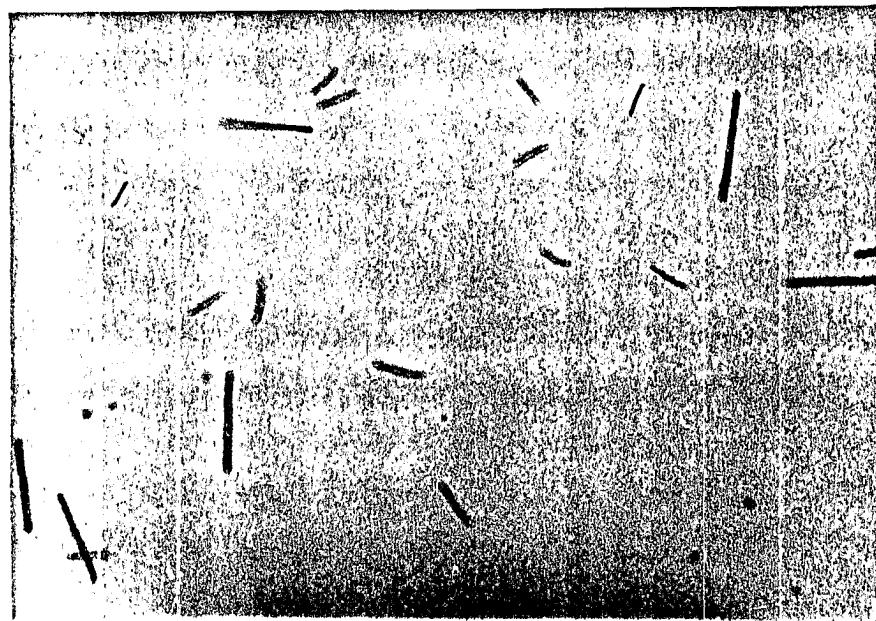
Cultivo de *C. pteridis* en papa-dextrosa-agar (PDA).



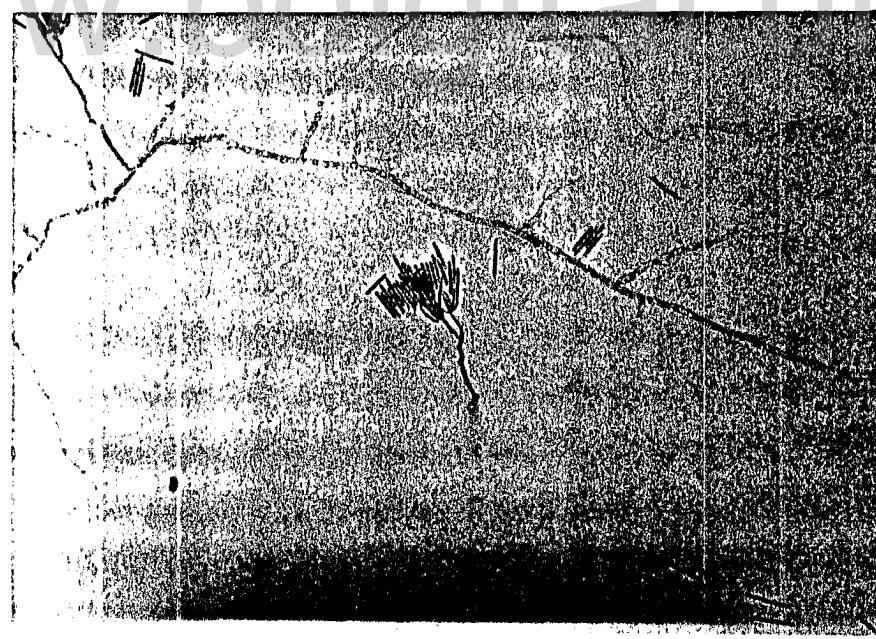
Conidióforo de *Cylindrocladium pteridis* con vesicula (a) y conidios (b).



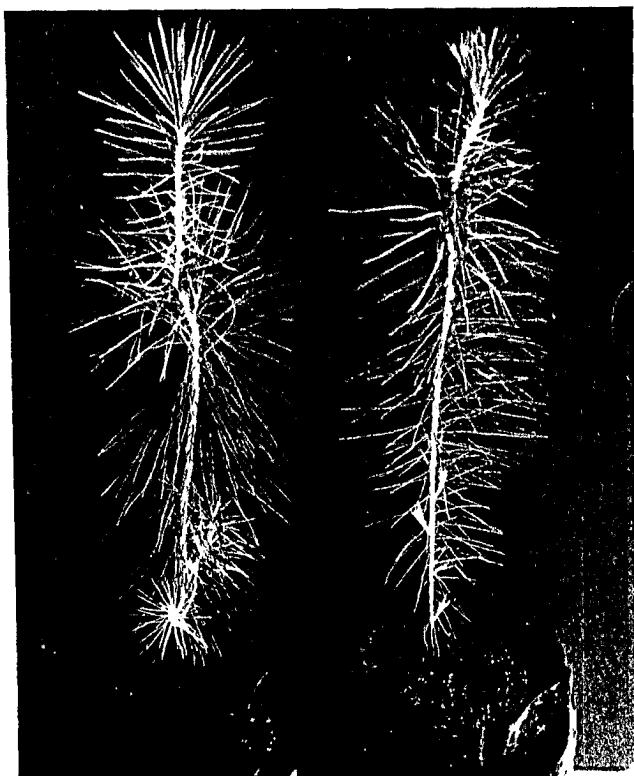
Macroconidios de *C. pteridis* con 1 a 3 septos.



Macro y microcondios de *C. pteridis*.

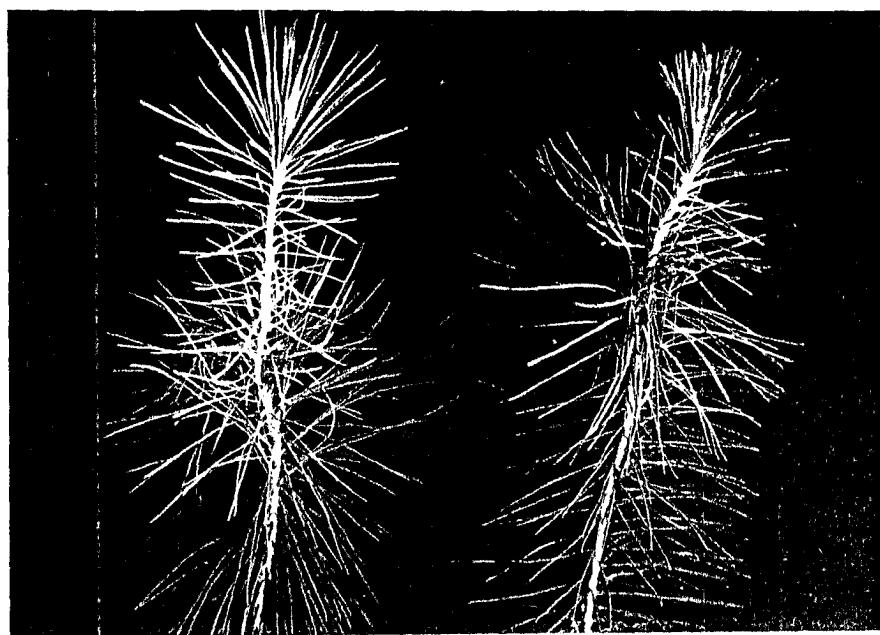


Microconidióforos y microconidios de *C. pteridis*.

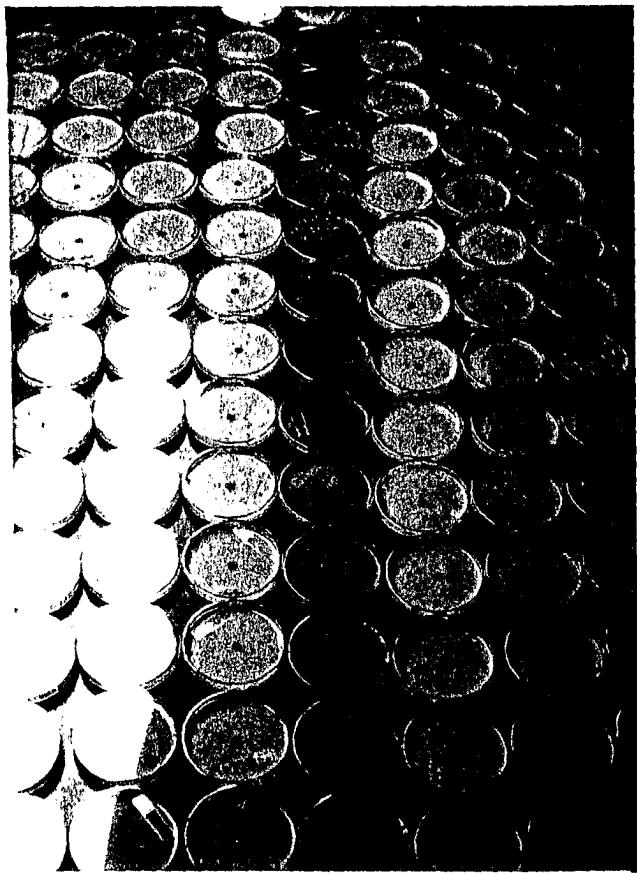


[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Plántulas de *P. caribaea* var. *hondurensis* inoculadas con *C. pteridis*.

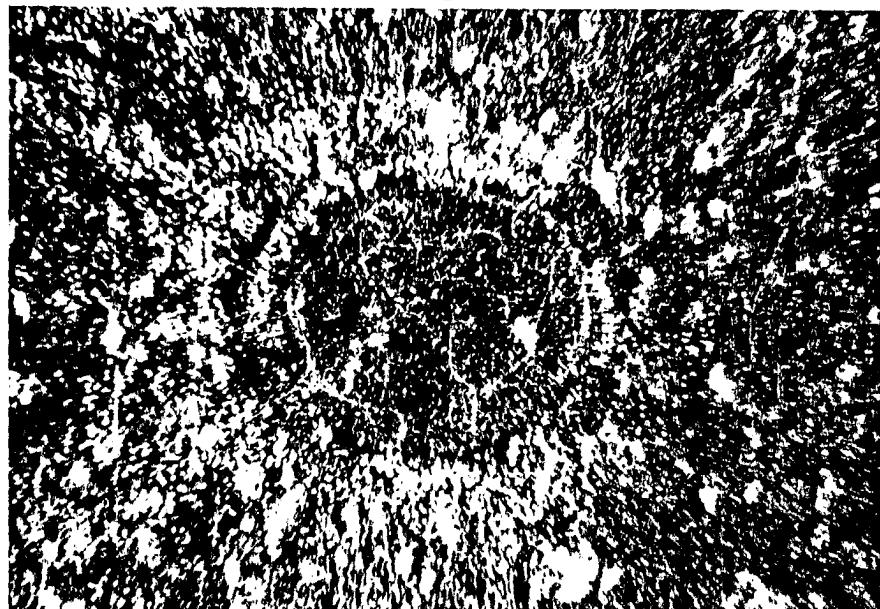


Plántulas de *P. caribaea* var. *hondurensis* inoculadas con *C. pteridis* mostrando síntomas de quemá en las acículas.

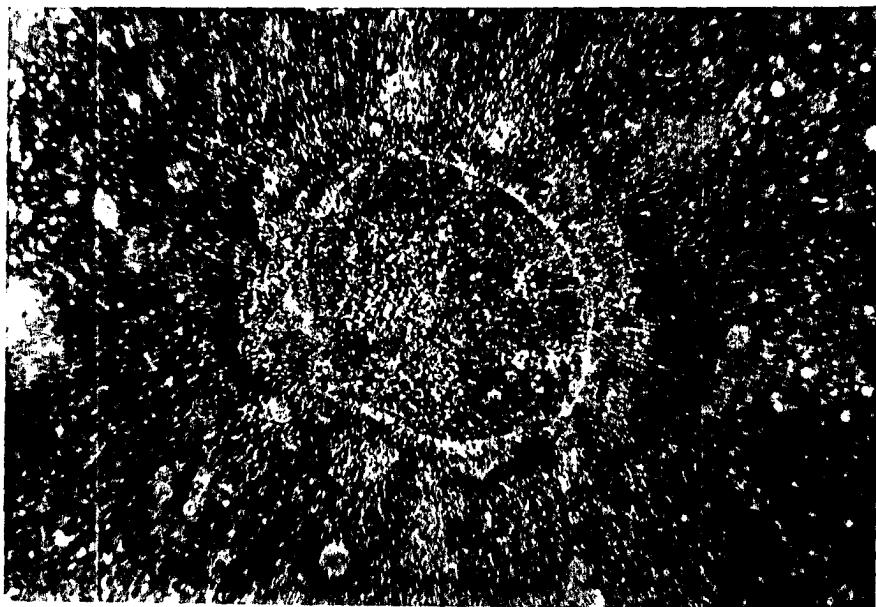


*C. pteridis* sometido a pruebas de sensibilidad.

[www.bdigital.ulb.ac.ve](http://www.bdigital.ulb.ac.ve)

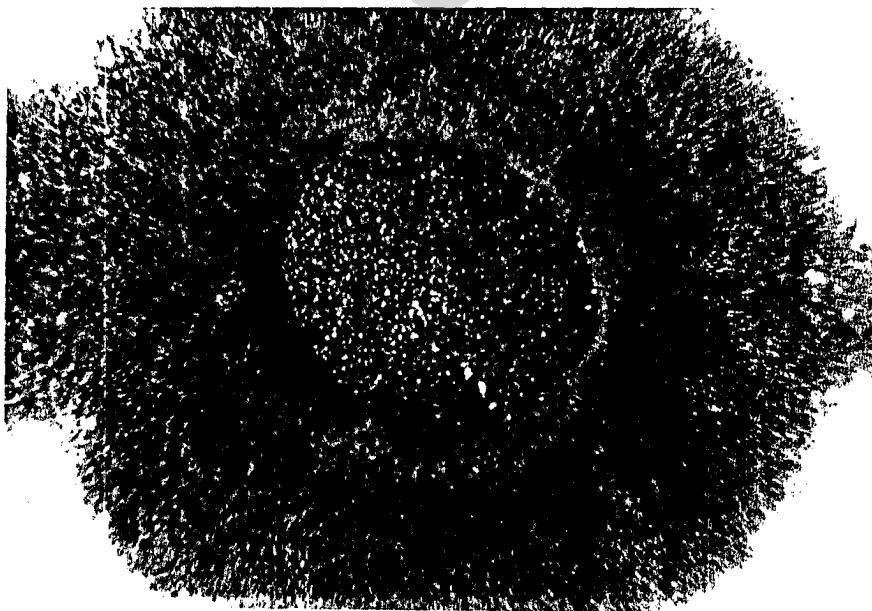


Pruebas de sensibilidad – Testigo.

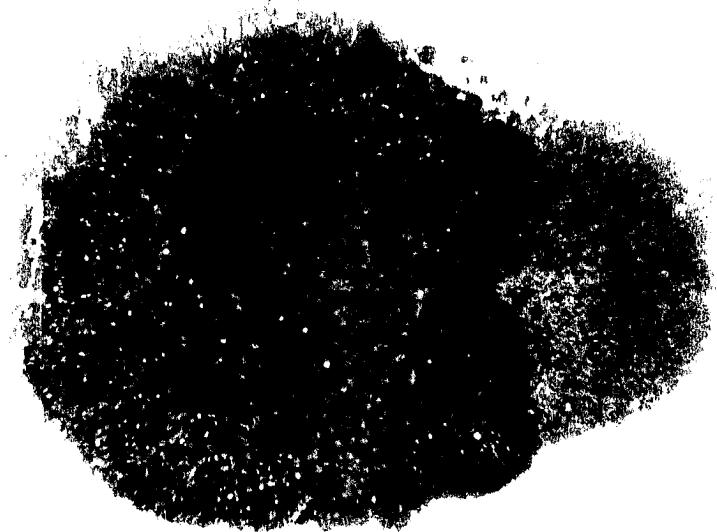


Prueba de sensibilidad – Clorotalonil.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

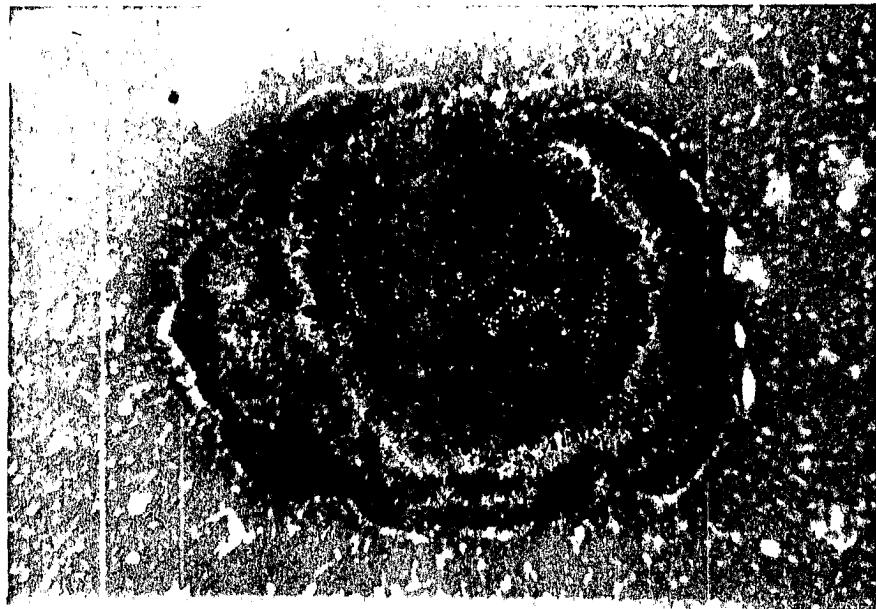


Prueba de sensibilidad – Propiconazole.

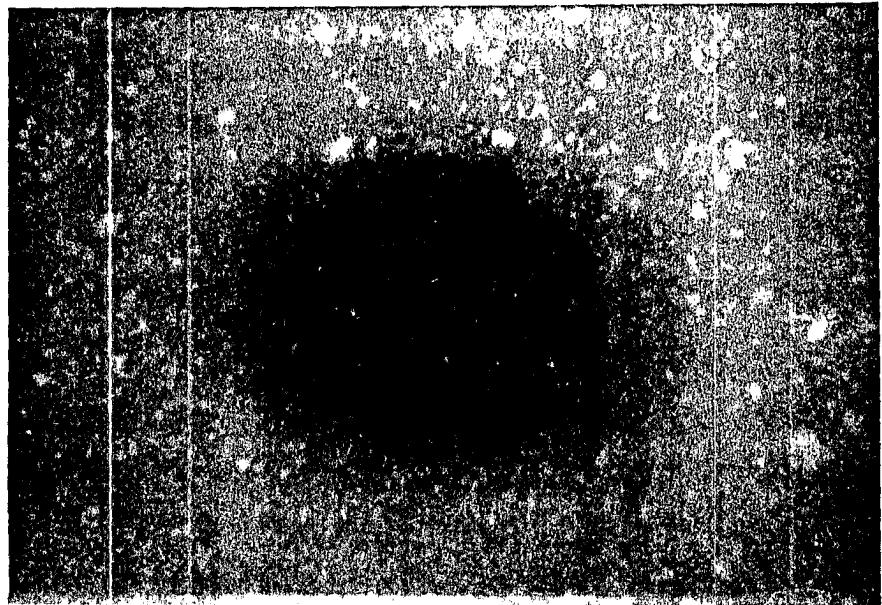


Prueba de sensibilidad – Folpet.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

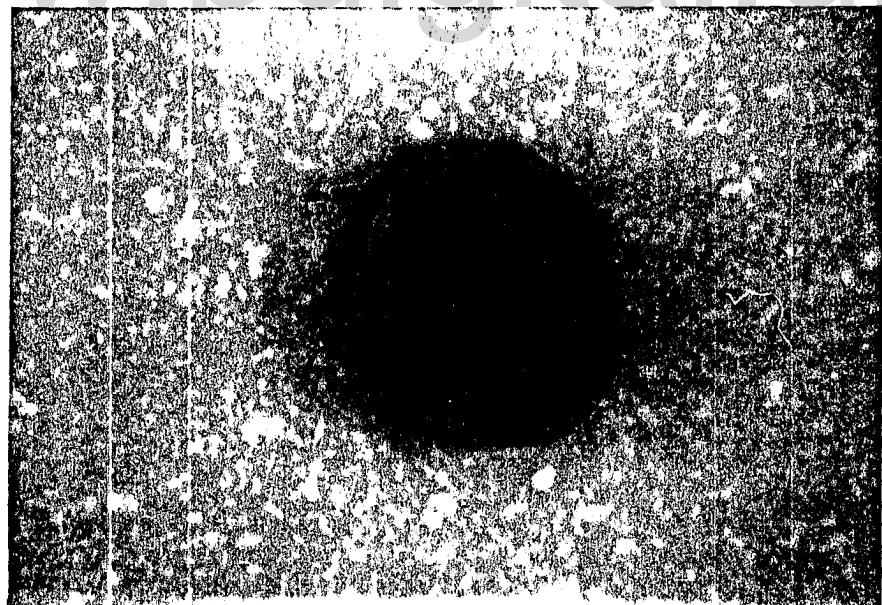


Prueba de sensibilidad – Oxicloruro de cobre.

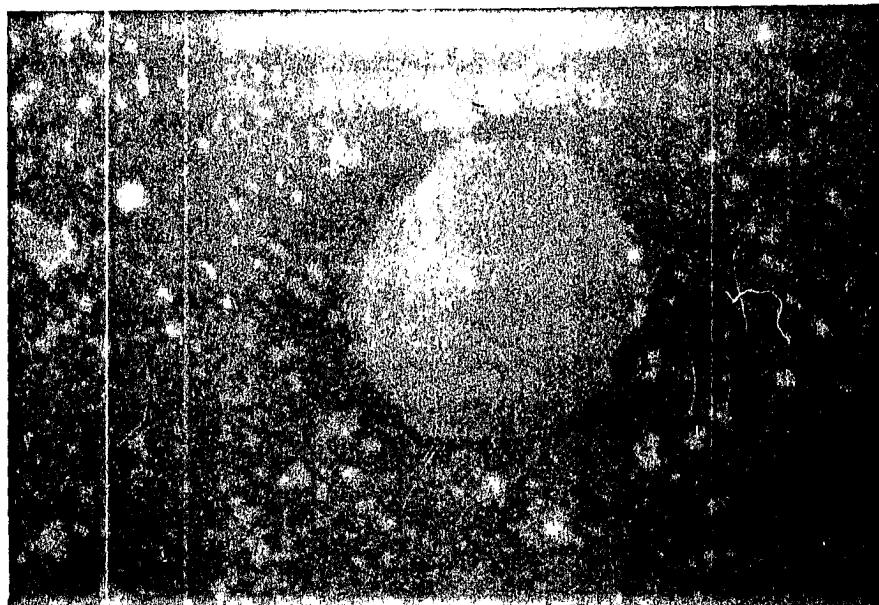


Prueba de sensibilidad – Funcoloraz.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

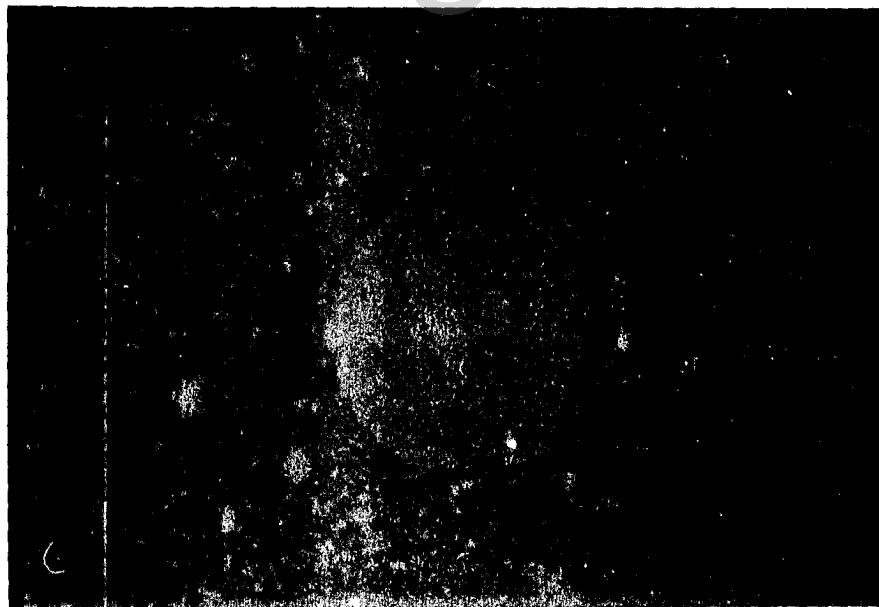


Prueba de sensibilidad – Benomil.



Prueba de sensibilidad – Carboximida.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



Prueba de sensibilidad – Mancozeb.

STATISTIX 4.0

PINO, 03/02/00, 14:48

## ANALYSIS OF VARIANCE TABLE FOR CRECIMIEN

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
TRATA (A)	8	39986.5	4998.31	6036.54	0.0000
REPET (B)					
A*B	261	216.110	0.82801		
TOTAL	269	40202.6			
GRAND AVERAGE	1	11004.9			

STATISTIX 4.0

PINO, 03/02/00, 14:48

## LSD (T) PAIRWISE COMPARISONS OF MEANS OF CRECIMIEN BY TRATA

TRATA	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
t.	39.500	I
cl	10.750	.. I
p	3.6000	.... I
o	3.3000	.... I
f	0.1750	..... I
fo	0.1333	..... I
m	0.0000	..... I
c	0.0000	..... I
b	0.0000	..... I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE  
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 1.969 REJECTION LEVEL 0.050  
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.4626  
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2349

ERROR TERM USED: TRATA\*REPET, 261 DF

Base de datos

<u>Tratamiento</u>	<u>Repetición</u>	<u>Crecimiento (mm)</u>
Funcloraz	1	1
Funcloraz	2	1
Funcloraz	3	0,5
Funcloraz	4	0,5
Funcloraz	5	0,25
Funcloraz	6	0
Funcloraz	7	0
Funcloraz	8	0
Funcloraz	9	0
Funcloraz	10	0
Funcloraz	11	0,25
Funcloraz	12	0
Funcloraz	13	0
Funcloraz	14	0
Funcloraz	15	0,25
Funcloraz	16	0
Funcloraz	17	0,25
Funcloraz	18	0
Funcloraz	19	0
Funcloraz	20	0
Funcloraz	21	0
Funcloraz	22	0
Funcloraz	23	0,25
Funcloraz	24	0
Funcloraz	25	0
Funcloraz	26	0
Funcloraz	27	0,25
Funcloraz	28	0
Funcloraz	29	0,5
Funcloraz	30	0,25
Benomil	1	0
Benomil	2	0
Benomil	3	0
Benomil	4	0
Benomil	5	0
Benomil	6	0
Benomil	7	0
Benomil	8	0
Benomil	9	0
Benomil	10	0
Benomil	11	0
Benomil	12	0
Benomil	13	0
Benomil	14	0
Benomil	15	0
Benomil	16	0
Benomil	17	0
Benomil	18	0
Benomil	19	0
Benomil	20	0
Benomil	21	0
Benomil	22	0
Benomil	23	0

Benomil	24	0
Benomil	25	0
Benomil	26	0
Benomil	27	0
Benomil	28	0
Benomil	29	0
Benomil	30	0
Clorotalonil	1	10,5
Clorotalonil	2	10
Clorotalonil	3	14
Clorotalonil	4	12
Clorotalonil	5	12
Clorotalonil	6	12
Clorotalonil	7	8
Clorotalonil	8	9
Clorotalonil	9	10
Clorotalonil	10	7
Clorotalonil	11	10
Clorotalonil	12	11
Clorotalonil	13	11
Clorotalonil	14	10
Clorotalonil	15	12
Clorotalonil	16	15
Clorotalonil	17	12
Clorotalonil	18	9
Clorotalonil	19	10
Clorotalonil	20	13
Clorotalonil	21	10
Clorotalonil	22	11
Clorotalonil	23	12
Clorotalonil	24	11
Clorotalonil	25	10
Clorotalonil	26	10
Clorotalonil	27	12
Clorotalonil	28	10
Clorotalonil	29	9
Clorotalonil	30	10
Folpet	1	3
Folpet	2	1
Folpet	3	0
Folpet	4	0
Folpet	5	0
Folpet	6	0
Folpet	7	0
Folpet	8	0
Folpet	9	0
Folpet	10	0
Folpet	11	0
Folpet	12	0
Folpet	13	0
Folpet	14	0
Folpet	15	0
Folpet	16	0
Folpet	17	0
Folpet	18	0
Folpet	19	0
Folpet	20	0

Folpet	22	0
Folpet	23	0
Folpet	24	0
Folpet	25	0
Folpet	26	0
Folpet	27	0
Folpet	28	0
Folpet	29	0
Folpet	30	0
Oxi. de cobre	1	3
Oxi. de cobre	2	1
Oxi. de cobre	3	8
Oxi. de cobre	4	0
Oxi. de cobre	5	2
Oxi. de cobre	6	2
Oxi. de cobre	7	4
Oxi. de cobre	8	5
Oxi. de cobre	9	2,5
Oxi. de cobre	10	1
Oxi. de cobre	11	2
Oxi. de cobre	12	1,5
Oxi. de cobre	13	4
Oxi. de cobre	14	2,5
Oxi. de cobre	15	4
Oxi. de cobre	16	3
Oxi. de cobre	17	6
Oxi. de cobre	18	4
Oxi. de cobre	19	7
Oxi. de cobre	20	1
Oxi. de cobre	21	3
Oxi. de cobré	22	4
Oxi. de cobre	23	6
Oxi. de cobre	24	1
Oxi. de cobre	25	6
Oxi. de cobre	26	3,5
Oxi. de cobre	27	5
Oxi. de cobre	28	3
Oxi. de cobre	29	3
Oxi. de cobre	30	1
Mancozeb	1	0
Mancozeb	2	0
Mancozeb	3	0
Mancozeb	4	0
Mancozeb	5	0
Mancozeb	6	0
Mancozeb	7	0
Mancozeb	8	0
Mancozeb	9	0
Mancozeb	10	0
Mancozeb	11	0
Mancozeb	12	0
Mancozeb	13	0
Mancozeb	14	0
Mancozeb	15	0
Mancozeb	16	0
Mancozeb	17	0
Mancozeb	18	8

Mancozeb	20	0
Mancozeb	21	0
Mancozeb	22	0
Mancozeb	23	0
Mancozeb	24	0
Mancozeb	25	0
Mancozeb	26	0
Mancozeb	27	0
Mancozeb	28	0
Mancozeb	29	0
Mancozeb	30	0
Carboximida	1	0
Carboximida	2	0
Carboximida	3	0
Carboximida	4	0
Carboximida	5	0
Carboximida	6	0
Carboximida	7	0
Carboximida	8	0
Carboximida	9	0
Carboximida	10	0
Carboximida	11	0
Carboximida	12	0
Carboximida	13	0
Carboximida	14	0
Carboximida	15	0
Carboximida	16	0
Carboximida	17	0
Carboximida	18	0
Carboximida	19	0
Carboximida	20	0
Carboximida	21	0
Carboximida	22	0
Carboximida	23	0
Carboximida	24	0
Carboximida	25	0
Carboximida	26	0
Carboximida	27	0
Carboximida	28	0
Carboximida	29	0
Carboximida	30	0
Propiconazole	1	3
Propiconazole	2	3
Propiconazole	3	3
Propiconazole	4	3
Propiconazole	5	4
Propiconazole	6	3,5
Propiconazole	7	3
Propiconazole	8	3,5
Propiconazole	9	3,5
Propiconazole	10	3
Propiconazole	11	4
Propiconazole	12	3,5
Propiconazole	13	6
Propiconazole	14	3,5
Propiconazole	15	4
Propiconazole	16	3,5
Propiconazole	17	3,5

Propiconazole	18	3,5
Propiconazole	19	4
Propiconazole	20	3,5
Propiconazole	21	3,5
Propiconazole	22	4
Propiconazole	23	4
Propiconazole	24	4
Propiconazole	25	3,5
Propiconazole	26	3,5
Propiconazole	27	3,5
Propiconazole	28	3
Propiconazole	29	3,5
Propiconazole	30	3,5
Testigo	1	39,5
Testigo	2	39,5
Testigo	3	39,5
Testigo	4	39,5
Testigo	5	39,5
Testigo	6	39,5
Testigo	7	39,5
Testigo	8	39,5
Testigo	9	39,5
Testigo	10	39,5
Testigo	11	39,5
Testigo	12	39,5
Testigo	13	39,5
Testigo	14	39,5
Testigo	15	39,5
Testigo	16	39,5
Testigo	17	39,5
Testigo	18	39,5
Testigo	19	39,5
Testigo	20	39,5
Testigo	21	39,5
Testigo	22	39,5
Testigo	23	39,5
Testigo	24	39,5
Testigo	25	39,5
Testigo	26	39,5
Testigo	27	39,5
Testigo	28	39,5
Testigo	29	39,5
Testigo	30	39,5

www.bdigital.ula.ve