UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
0200118237

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

ALTERACIONES EN NASCENCIA Y ENRAIZAMIENTO DE ALGUNAS PLANTAS ORNAMENTALES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

TESIS DOCTORAL

MARÍA LUISA TELLO MARISCAL

Ingeniero Agrónomo

MADRID 1998

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

ALTERACIONES EN NASCENCIA Y ENRAIZAMIENTO DE ALGUNAS PLANTAS ORNAMENTALES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID
E. T. S. I. AGRONOMOS
BIBLIOTECA
FECHA ENTRADA 23-IV-98
Nº DOCUMENTO
Nº EJEMPLAR
SIGNATURA T 516
R. 712-T

DOCTORANDO
MARÍA LUISA TELLO MARISCAL
INGENIERO AGRÓNOMO

DIRECTOR
ELOY MATEO-SAGASTA AZPEITIA
DR. INGENIERO AGRÓNOMO

Madrid, 1998

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL **1**

1.1 ANTECEDENTES 3
1.2 EL CULTIVO DE PLANTA ORNAMENTAL EN LA COMUNIDAD DE MADRID 5
1.3 EL GÉNERO CUPRESSUS (FAM. CUPRESSACEAE) 7
1.4 EL GÉNERO PETUNIA (FAM. SOLANACEAE) 10
1.5 LA CLASE OOMYCETES Y LOS GÉNEROS PYTHIUM Y PHYTOPHTHORA 11
1.5.1 EL GÉNERO PYTHIUM *12*
1.5.2 EL GÉNERO PHYTOPHTHORA *13*
1.5.3 DIFERENCIASENTRE PYTHIUM Y PHYTOPHTHORA *14*
1.5.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS *15*
1.6 PATOGENICIDAD Y DIAGNOSIS 17
1.6.1 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR PYTHIUM *18*
1.6.2 CICLO DE LA ENFERMEDAD *20*
1.6.3 TOLERANCIA DE LA PLANTA *21*
1.7 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD 22
1.8 CONTROL QUÍMICO. 27

2. OBJETIVOS GENERALES **33**

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES **37**

3.1 MATERIALES 39
3.1.1 SUSTRATO *39*
3.1.2 MATERIAL VEGETAL *40*
3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO *40*
3.1.4 INÓCULOS *43*
3.2 MÉTODOS 44
3.2.1 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y AISLAMIENTO *44*
3.2.2 TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS *45*
3.2.3 TÉCNICA DE RECUPERACIÓN DE PATÓGENO *45*
3.2.4 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS *47*
3.2.5 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO *49*
3.2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS *53*

4. ENFERMEDADES OBSERVADAS EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES DE LA COMUNIDAD DE MADRID **57**

4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 59
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 60
4.2.1 IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO *60*
4.2.2 AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS *60*
4.2.3 BIOENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS *61*
4.3 RESULTADOS 66
4.3.1 IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO *66*
4.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA *68*
4.3.3 DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD *77*
4.3.4 ENSAYO DE VIRULENCIA COMPARADA *78*
4.3.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO *86*
4.4 DISCUSIÓN 99

5. INFLUENCIA DEL MOMENTO DE INOCULACIÓN CON RELACIÓN A LA EDAD DEL HUÉSPED. 103

5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 105
5.1.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS 105
5.1.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO 105
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS 106
5.2.1 MATERIALES 106
5.2.2 MÉTODOS 107
5.3 RESULTADOS 117
5.3.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS 117
5.3.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO 137
5.4 RESÚMEN DE RESULTADOS 167
5.4.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS 167
5.4.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO 169
5.5 DISCUSIÓN 171
5.5.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS 171
5.5.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO 172

6. ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED: EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS 175

6.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 177
6.1.1 PRIMER ENSAYO 177
6.1.2 SEGUNDO ENSAYO 177
6.1.3 TERCER ENSAYO 178
6.2 MATERIALES Y MÉTODOS 179
6.2.1 PRIMER ENSAYO 179
6.2.2 SEGUNDO ENSAYO 180
6.2.3 TERCER ENSAYO 182
6.2.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS 183
6.3 RESULTADOS 184
6.3.1 PRIMER ENSAYO 184
6.3.2 SEGUNDO ENSAYO 186
6.3.3 TERCER ENSAYO 191
6.4 DISCUSIÓN 199

7. CONTROL: MOMENTO DE APLICACIÓN DEL FUNGICIDA 203

7.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS 205
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS 205
7.2.1 DISEÑO ESTADÍSTICO 206
7.2.2 PRIMER ENSAYO 207
7.2.3 SEGUNDO ENSAYO 208
7.2.4 TERCER ENSAYO 209
7.2.5 CUARTO ENSAYO 211
7.3 RESULTADOS 212
7.3.1 PRIMER ENSAYO 212
7.3.2 SEGUNDO ENSAYO 229
7.3.3 TERCER ENSAYO 242
7.3.4 CUARTO ENSAYO 255
7.4 DISCUSIÓN 271

8. DISCUSIÓN GENERAL 275

8.1 PATOGENICIDAD, VIRULENCIA Y MORTALIDAD 277
8.2 GERMINACIÓN DE CUPRESSUS 279
8.3 IRREGULARIDAD DE RESULTADOS 280
8.4 EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO 281
8.5 DAÑOS EN RAÍZ 283

9. CONCLUSIONES GENERALES **285**

10. BIBLIOGRAFÍA **289**

11. RESUMEN **301**

12. SUMMARY **305**

13. ANEJOS **309**

13.1 CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS DE LOS SUSTRATOS 311
13.2 DATOS METEOROLÓGICOS 313
13.3 ESPECIES VEGETALES MUESTREADAS Y VIVEROS ESTUDIADOS 317
13.4 TABLAS DE DATOS DE LOS ENSAYOS PREVIOS 319
13.5 TABLAS DE DATOS DE CAMPO 331
13.6 TABLAS DE DATOS DE ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS 347
13.7 AJUSTE A MODELOS NO LINEALES LINEALIZABLES 351
13.8 TABLAS DE DATOS DE LOS ENSAYOS DE ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED 365
13.9 TABLAS DE DATOS DE LOS ENSAYOS DE CONTROL 371

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 ANTECEDENTES

El conocimiento sobre enfermedades de plantas ornamentales en España es bastante incompleto, tanto en el aspecto de presencia de posibles parásitos sobre diferentes especies ornamentales (o utilizadas como tales), como en la valoración real de los daños que producen y en los estudios necesarios sobre estos parásitos que, aunque a veces sean conocidos y estudiados en cultivos agrícolas más o menos masivos, cuando se presentan en un medio ambiente con características, en muchas ocasiones, tan especiales como es la utilización de ornamentales, hace que aparezcan diferencias sustanciales en la gravedad de los daños producidos y posibilidades de aplicación de medios de lucha. Este trabajo pretende ser pionero sobre estos temas y empezar un camino que, desde luego, será largo y complicado.

El motivo que impulsó este estudio fue la existencia de un problema sanitario en los viveros de producción de planta ornamental de la Comunidad de Madrid, por cuyos síntomas deducíamos que estaba relacionado con afecciones de raíz, y que habitualmente quedaba oculto por la aplicación de tratamientos fitosanitarios reiterados y sistemáticos carentes de diagnostico previo.

La bibliografía extranjera hace referencia a numerosos casos de enfermedades de plantas forestales y ornamentales debidas a hongos del suelo, y más concretamente a hongos de la familia *Pythiaceae* en la fase de producción en vivero (HENDRIX Y CAMPBELL,1966; HENDRIX Y CAMPBELL,1968; HANSEN Y COL.,1979; VEGH Y LE BERRE,1985; PERRIN Y SAMPANGI,1986; FARR Y COL.,1989; JACQUIN Y CHAUVEL,1993). Sin embargo, no había estudios precedentes en nuestra zona sobre las enfermedades que afectaban a las especies ornamentales. La experiencia del Catedrático de Patología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, Prof. D. ELOY MATEO-SAGASTA AZPEITIA, poseedor de un conocimiento de los problemas sanitarios acumulado a lo largo de muchos años, como fruto de las consultas efectuadas por organismos públicos. entidades privadas y particulares, sirvió como valioso material de partida, aunque necesitado de sistematización y de un estudio más detenido.

Este trabajo de investigación sobre las plantas ornamentales en la Comunidad de Madrid, comenzado a finales de 1991, se ha centrado en las primeras etapas del cultivo, es decir la producción en vivero, porque el estado sanitario en esas primeras fases puede repercutir más adelante en la implantación y conservación en su ubicación definitiva, ya sea parque o jardín, público o privado, fuera o dentro de la ciudad, y puede también repercutir en la sanidad de las otras plantas cultivadas en el mismo emplazamiento.

¿Por qué comenzamos este trabajo? Porque en aquel momento existía una inquietud en el sector productor de planta ornamental de la Comunidad de Madrid que se daba cuenta del escaso conocimiento que había sobre los problemas patológicos que afectaban a sus producciones, y por otro lado, existía también una voluntad por parte de la Comunidad de Madrid de colaborar en la solución de los problemas que aquejaban a este sector productivo. Se necesitaba, por tanto, un estudio más completo y sistemático que nos ayudara a identificar los problemas para hacerles frente. De modo que, a través de sucesivos proyectos de investigación financiados por el Plan Regional de Investigación de la Comunidad de Madrid,

nos fue posible iniciar el estudio de las alteraciones en las fases de enraizamiento y primer desarrollo de las plantas ornamentales producidas en la región.

1.2 EL CULTIVO DE PLANTA ORNAMENTAL EN LA COMUNIDAD DE MADRID

El sector productor de plantas de vivero en la Comunidad de Madrid comprende actualmente (datos de febrero de 1998) un total de 126 viveros registrados. según los datos facilitados por la Sección de Sanidad Vegetal de la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad de Madrid. En el mes de marzo de 1995, el número de viveros registrados era 111; pero conviene resaltar que estas cifras se refieren a viveros registrados y no aluden necesariamente al total de viveros que ejercen su actividad en la región. Además, los datos se refieren exclusivamente a los viveros que producen planta. No existen datos sistematizados sobre los que únicamente comercializan. La superficie total ocupada por estos viveros es de 39.816 áreas, de las cuales la mayor parte corresponde a cultivos al aire libre (37.117 áreas) frente a la menor extensión de los cultivos protegidos (2.699 áreas). Las zonas protegidas comprenden tanto invernaderos de cristal automatizados, más utilizados para la producción de plantas delicadas de flor o de interior, como túneles de plástico de estructura sencilla y carentes de toda sofisticación, más apropiados para árboles y arbustos de exterior, aromáticas y anuales en las primeras fases de su cultivo (semillero, estaquillado, transplante). La superficie media total es de 316 áreas por vivero, con una media de 294 áreas de cultivo al aire libre y 21 áreas de superficie protegida.

Según la misma fuente, actualmente el 92% de los viveros producen plantas ornamentales, el 37% plantas forestales y el 44% plantas aromáticas. Dentro de estas tres categorías, clasificando las plantas por grupos de producción, resulta que el 67% de los viveros producen coníferas para jardinería, el 64% otros árboles y arbustos para jardinería, el 60% plantas anuales, el 44% plantas aromáticas, el 40% plantas bisanuales, el 34% coníferas para repoblación forestal, el 31% frondosas para repoblación forestal y, con porcentajes inferiores al 20%, grupos tales como rosas (16%), planta de interior (14%), clavel (10%), bulbos (9%) y otras producciones menos extendidas como césped en tepes, cactáceas y plantas crasas, semillas para venta o plantas mediterráneas. No hay datos en relación a las cantidades de planta producidas.

A pesar del elevado número de viveros productores, el sector viverista de Horticultura Ornamental de la Comunidad de Madrid produce "in situ" una parte relativamente pequeña de la cantidad de planta que comercializa. Desafortunadamente esta afirmación no puede basarse en cifras, que no existen, sino en apreciaciones nacidas de nuestra propia experiencia. Mayoritariamente compran la planta a cultivadores de otros países, de otras Comunidades Autónomas o la producen ellos mismos en instalaciones propias ubicadas fuera de la Comunidad de Madrid. Dentro de nuestra región se concentran en una cierta recría y en la conservación hasta el momento de la venta a los establecimientos minoristas, propios o ajenos, y/o al consumidor.

En el cultivo de las plantas ornamentales en nuestra región existen problemas sanitarios, y en general, los productores desconocen la causa de las alteraciones. Con frecuencia los daños son de importancia pero el productor compensa los gastos provocados por la enfermedad con el beneficio que le reporta la venta de otros cultivos o de las plantas que se libran de la enfermedad y que, por tratarse de cultivos ornamentales, alcanzan un precio de mercado muy elevado. Es decir, las pérdidas por la enfermedad se diluyen en el

balance contable compensadas por los beneficios del alto precio de la mercancía que no se ha perdido. Pero, indudablemente, un avance en la sanidad de los cultivos sería deseable puesto que mejoraría esta situación tanto para el productor como para el consumidor, incrementando la competitividad de nuestra producción frente a las de otras zonas u otros países.

Además, el conocimiento en materia de sanidad vegetal es bastante limitado entre los que se dedican a la producción de plantas, en gran parte debido a la complejidad intrínseca de la materia, puesto que la Horticultura Ornamental comprende un elevado número de especies vegetales de muy diversos géneros y con muy diversos requerimientos, e incluso peculiaridades, de cultivo. La gama de parásitos susceptibles de afectar a tan alto número de huéspedes es, a su vez, muy amplia y dispar. Y la característica de "ornamental" que caracteriza a todos ellos complica la adopción de medidas de control de carácter general.

Por otro lado, de entre todas las etapas del cultivo de planta ornamental, probablemente las más críticas y delicadas sean las primeras fases de establecimiento en semillero, o cualquier medio de propagación vegetativa (estaquillado, injerto, etc.), y el transplante (MITCHELL Y KANNWISCHER-MITCHELL,1992; JACQUIN Y CHAUVEL,1993). Es en esos momentos cuando la planta joven es más débil y más propensa al ataque por parte de los agentes patógenos. En estas fases las afecciones en raíz, cuello o zona basal del tallo son frecuentes y peligrosas. En la Comunidad de Madrid, las pérdidas suponen aproximadamente un 10% de las plantas, pero pueden alcanzar hasta más del 50% en los casos graves.

1.3 EL GÉNERO CUPRESSUS (FAM. CUPRESSACEAE)

La familia *Cupressaceae,* comprende de 18 a 20 géneros que agrupan alrededor de 150 especies repartidas prácticamente por todo el mundo (LÓPEZ GONZÁLEZ,1993). Según el mismo autor, la familia se encuentra representada por un grupo distinto en cada hemisferio. En Europa los géneros más conocidos, según lo recogido en *Flora Europaea* por HEYWOOD (1964) son los siguientes: *Thuja, Juniperus, Tetraclinis, Calocedrus, Chamaecyparis* y *Cupressus.* Esta familia comprende especies de gran importancia forestal, aunque no maderable, muy usadas en repoblaciones y de elevado valor estético y ornamental (LÓPEZ GONZÁLEZ,1993). Otras utilizaciones de las Cupresáceas recogidas por LÓPEZ GONZÁLEZ (1993) apuntan a su uso medicinal, industrial e incluso alimentario (licores).

Como características generales de las Cupresáceas todos los autores consultados (HEYWOOD,1964; EHRENDORFER,1986; LÓPEZ GONZÁLEZ,1993) las definen como plantas leñosas, tanto árboles como arbustos, resinosas con hojas aciculares o con forma de escamas dispuestas en verticilos u opuestas, y que permanecen sin caer durante todo el año. LÓPEZ GONZÁLEZ (1993) describe los órganos sexuales de la siguiente forma: "Producen conos masculinos y femeninos con escamas enfrentadas o en verticilos, que pueden ir en la misma planta o existir plantas de distinto sexo. Los conos masculinos tienen de 3 a 5 bolsitas de polen debajo de cada escama y las femeninas de 2 a 15 primordios seminales por escama. Producen fructificaciones leñosas (estróbilos) o carnosas y abayadas (gálbulos o arcéstidas)".

El género *Cupressus* L. se clasifica dentro de la subfamilia *Cupressoideae* y la tribu *Cupresseae* (TUSET E HINAREJOS,1995). Como nota curiosa, señala LÓPEZ GONZÁLEZ (1993) que hay dos versiones en cuanto al origen del nombre del género *Cupressus.* Según la primera, el género toma su nombre del griego "*Kypros*", que significa Chipre, isla en la que su presencia es muy abundante[1]; la segunda es que procede de "*Kyparissos*" que según la mitología era hijo de Telefo y fue transformado en ciprés por Apolo. Existe una tercera posibilidad que se cita en el *Dictionary of Gardening* (CHITTENDEN,1951) como vocablo procedente etimológicamente de "*kus*" (producir) y "*parisos*" (igual) aludiendo al crecimiento simétrico de la copa de los cipreses.

El género se compone de árboles y arbustos longevos[2] que pueden alcanzar de 30 a 40 m de altura y más de 100 cm de diámetro (LÓPEZ GONZÁLEZ,1993; TUSET E HINAREJOS,1995). Preferentemente exhiben un porte cónico o columnar (típico del clásico ciprés de los cementerios), aunque la proliferación de variedades para jardinería favorece otro tipo de formaciones de alto valor estético, como por ejemplo, el crecimiento de ramas horizontales e incluso arbustos de porte rastrero. Estas plantas presentan un dimorfismo que distingue el período juvenil de la planta adulta; mientras en las plantas jóvenes las hojas son aciculares, casi punzantes, con el limbo alargado y separado del tallo; en las adultas se presentan las hojas escuamiformes propias de la familia, con una pequeña glándula resinosa en el dorso,

[1] Refiriéndose al ciprés común (*Cupressus sempervirens* L.) que es originario del Mediterráneo oriental.

[2] TUSET E HINAREJOS (1995) indican que pueden vivir durante varios siglos e incluso citan a GELLINI que, en 1976 les atribuye una longevidad de milenios. LÓPEZ GONZÁLEZ (1993) advierte que la longevidad de las Cupresáceas puede superar los 500 años y, en algunos ejemplares, llegar al milenio.

imbricadas, dispuestas muy próximas al tallo e incluso concrescentes a él (CHITTENDEN,1951; TUSET E HINAREJOS,1995).

Otra diferencia destacable entre las fases juvenil y adulta se establece en la estructura del sistema radicular: las plantas en sus primeras etapas de vida desarrollan una raíz principal pivotante, poco ramificada, de desarrollo muy profundo, en tanto que las plantas adultas lucen una raíz más ramificada y superficial (TUSET E HINAREJOS,1995).

El género *Cupressus* es monoico con flores masculinas en amentos pequeños, que se hacen visibles en invierno. Las femeninas son subglobosas con 6-12 escamas, llevan un pequeño mucrón dorsal y dan lugar a frutos de tipo estróbilo con escamas leñosas soldadas por sus márgenes que maduran al segundo año, a finales de verano, cuando se abren y liberan las semillas (EHRENDORFER,1986; CATALÁN BACHILLER,1991; TUSET E HINAREJOS,1995).

Una característica importante del género *Cupressus* es que no dispone de yemas propiamente dichas, de forma que el crecimiento se debe a los ápices caulinares. Estos continúan su desarrollo durante todo el tiempo en que las condiciones ambientales son favorables y lo interrumpen en los momentos de excesivo calor o frío, sin necesidad de parada invernal (TUSET E HINAREJOS,1995).

La distribución geográfica del género *Cupressus* se sitúa en las zonas templadas de cuatro continentes: Europa, Asia, América y África (TUSET E HINAREJOS,1995). Las especies del género se adaptan a muy diversas condiciones de suelo y fertilidad y son apropiadas para condiciones rigurosas de escasez de agua y calor. No es un género indígena de Europa central (EHRENDORFER,1986).

Los cipreses, en los viveros de producción de la Comunidad de Madrid, se multiplican normalmente por semilla, como se recomendaba en el *Dictionary of Gardening* (CHITTENDEN,1951). CATALÁN (1991) sitúa el porcentaje de germinación de las semillas de *Cupressus arizonica* var. *glabra* en torno al 20-30%. La germinación se favorece con tratamientos previos en los que se somete a las semillas a condiciones de frío, o remojándolas durante 24-48 horas antes de la siembra, y preferentemente, utilizando la semilla producida por estróbilos maduros de 1,5 a 2 años (CHITTENDEN,1951; CATALÁN BACHILLER,1991; TUSET E HINAREJOS,1995). En muy contadas ocasiones se propagan vegetativamente por estaquilla y por injerto de púa.

TUSET E HINAREJOS (1995) apuntan los principales usos de las Cupresáceas en España. En primer lugar, el ornamental, en jardines y parques, tanto con árboles aislados como para la formación de setos o arbustos sometidos a podas de formas caprichosas; el uso como barreras cortavientos o como pantallas acústicas y visuales, y por último, su utilización forestal para repoblaciones, siendo tanto planta principal como acompañante de otras especies.

El género *Cupressus* L. comprende más de veinte especies repartidas por el hemisferio norte. La especie *Cupressus arizonica*, conocida como "ciprés de Arizona", procede del norte de Méjico y del suroeste de Estados Unidos (AMARAL FRANCO,1964; LÓPEZ GONZÁLEZ,1993; TUSET E HINAREJOS,1995), en el área de Arizona, de donde le viene el nombre. Fue

introducida en Europa principalmente para su uso en jardinería[3], aunque también se ha empleado en repoblaciones forestales como la de Despeñaperros (LÓPEZ GONZÁLEZ,1993).

Hay cierta discrepancia en cuanto a la taxonomía de esta especie. LÓPEZ GONZÁLEZ (1993) hace referencia a la variedad *glabra* (Sudw.)Little, dentro de la especie *C.arizonica* E.L.Greene, como la más cultivada en España y resalta la corteza lisa de color pardo-rojizo, que se desprende en láminas delgadas, y la coloración blanco-azulada de sus hojas y conos femeninos. Destaca también la exudación resinosa de color blanco que frecuentemente aparece en el dorso de las hojas y que, en ocasiones, se hace muy evidente. Por el contrario, otros autores (DALLIMORE Y JACKSON,1966) citados por TUSET E HINAREJOS (1995) consideran dos especies distintas: *C.arizonica* Greene (ciprés de Arizona) y *C. glabra* Sudw. (ciprés liso de Arizona). Las diferencias entre ellas radican en el color del follaje (verde grisáceo en la primera y azulado-plateado en la segunda), en la corteza del tronco (fibrosa en *C.arizonica* y escamosa en *C.glabra*), y en la mayor importancia de las glándulas productoras de resina en la segunda especie. En este trabajo hablaremos de *Cupressus arizonica* Greene acogiéndonos al primer criterio, ya que observamos que en los viveros de producción de la zona no solía hacerse distinción de tal magnitud.

Cupressus macrocarpa Hartw. (ciprés de Monterrey o ciprés de Lambert) fue descrito en 1847 (AMARAL FRANCO,1964), procede de California y es muy sensible al "chancro", enfermedad producida por diversos hongos fitopatógenos (TUSET E HINAREJOS,1995). En esta especie el follaje es de un verde intenso (CHITTENDEN,1951). Su cultivo como planta ornamental está más extendido por el sur y el oeste de Europa, principalmente en las zonas próximas al mar (TUSET E HINAREJOS,1995). Se adapta peor a la formación de setos que la especie anterior (CHITTENDEN,1951).

Por su parte, *Cupressocyparis leylandii* fue descrito por WELSHPOOL en 1888 como *Cupressus* × *Leylandii* refiriéndose al híbrido entre *Chamaecyparis nootkatensis* y *Cupressus macrocarpa* (CHITTENDEN,1951).

En el capítulo de enfermedades de las Cupresáceas, TUSET E HINAREJOS (1995) dedican una obra completa a este asunto. Sorprende, sin embargo comprobar que, entre la relación de patógenos más importantes en España, e incluso entre los no presentes en nuestro país, solo se cita *Armillaria* como patógeno en raíz, pero no se incluye ninguno de los principales "hongos de suelo", como *Fusarium* o *Rhizoctonia*, y ningún representante de los pitiáceos, ni *Pythium* ni *Phytophthora*. Por el contrario, en el Reino Unido, ya en el año 1951 se hace referencia a las podredumbres de raíz como enfermedades habituales en coníferas (CHITTENDEN,1951). Otros autores han detectado diversas especies de *Pythium* y *Phytophthora* en *Cupressus* (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; PHILLIPS Y BURDEKIN,1982) o en coníferas en general, fundamentalmente en *Pinus* (EDMONDS Y HEATHER,1973; DARVAS Y COL.,1978; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; JAMES,1985; PERRIN Y SAMPANGI,1986; HANSEN Y LEWIS,1997).

[3] Especie muy apreciada para la formación de setos porque soporta bien las podas y las condiciones de sequía y altas temperaturas.

1.4 EL GÉNERO PETUNIA (FAM. SOLANACEAE)

Según los datos recogidos en la *Enciclopedia de Plantas y Flores*, editada por la *Royal Horticultural Society* en 1990, y por otros autores (BAILEY,1933; CHITTENDEN,1951; MOORE,1964) el género *Petunia* Juss. pertenece a la importantísima familia *Solanaceae*. Es un género oriundo de las regiones templadas de Sudamérica (MOORE,1964; EHRENDORFER,1986), principalmente Argentina y Brasil (CHITTENDEN,1951), y de elevado valor ornamental por sus flores. Etimológicamente, el nombre del género proviene de la palabra "*petun*" con la que los brasileños designaban al tabaco, importante cultivo estrechamente emparentado (BAILEY,1933; CHITTENDEN,1951). Aunque usadas como anuales en jardinería, el género se compone de plantas perennes con flores de colores vistosos (BAILEY,1933; BRICKELL,1990). Son plantas de cultivo sencillo siempre que dispongan de un suelo fértil. Se multiplican por semillas en primavera.

El género *Petunia* comprende alrededor de 12 especies, de las que solo una o dos crecen espontáneamente en Méjico y otra en el sur de Estados Unidos (BAILEY,1933).

Se cultivan múltiples variedades de la especie *Petunia hybrida,* con flores dobles o simples de muy diversos colores. Las plantas se desarrollan rápidamente alcanzando una altura de 15 a 30 cm y una anchura de 30 cm. Las plantas presentan abundantes ramificaciones en el tallo, con hojas alternas o opuestas, pequeñas, ovales, enteras y blandas, recubiertas de pelos pegajosos y flores solitarias que nacen en las axilas de las hojas superiores, con un cáliz acampanado y una corola en forma de embudo o de trompeta y en colores que van del blanco al rosa o violeta (BAILEY,1933; CHITTENDEN,1951; MOORE,1964; BRICKELL,1990). La floración se produce a finales del verano y principios de otoño, aproximadamente a los dos o tres meses de la siembra, si se cultivan al aire libre. Cuando emergen las plantitas son erectas, pero en seguida comienzan a esparcirse desordenadamente (CHITTENDEN,1951). Hay dos grandes grupos de híbridos: grandiflora y multiflora (BRICKELL,1990). Se multiplican principalmente por semilla, aunque es viable su propagación por estaquilla (BAILEY,1933). Un fenómeno curioso que ocurre con las petunias es que las plántulas más débiles del semillero son las que darán lugar a las adultas más vigorosas y viceversa (BAILEY,1933).

En lo referente a sanidad, en la *Enciclopedia de Plantas y Flores* (BRICKELL,1990) solo se hace mención a las afecciones víricas. BAILEY , por su parte, especificaba en 1933 que no había plagas o enfermedades de importancia que afectaran a *Petunia*. Sin embargo, a pesar de que las referencias bibliográficas acerca de los patógenos que afectan a *Petunia* son escasas, algunos autores, más recientemente, mencionan a este género como huésped de algunos hongos del suelo, hongos de parte aérea y bacterias (CHITTENDEN,1951; SMITH,1981). Los patógenos de suelo que aparecen citados con mayor frecuencia son del género *Phytophthora* (CHITTENDEN,1951; SMITH,1981), en concreto *Phytophthora cryptogea* (CHITTENDEN,1951) y *Phytophthora parasitica.*

1.5 LA CLASE OOMYCETES Y LOS GÉNEROS PYTHIUM Y PHYTOPHTHORA

La taxonomía de estos hongos es compleja, no hay uniformidad de criterios. El género *Pythium* fue creado por PRINGSHEIM en 1858. Anteriormente, en 1823, otro taxónomo, NEES, había utilizado ese mismo nombre. Fue el propio PRINGSTEIN el que incluyó el género *Pythium* en la familia *Saprolegniaceae*, y su criterio fue seguido por CORNU en 1872 y por BERLESE Y DE TONY en 1888. Por su parte, DE BARY en 1881 y FISCHER en 1892 lo situaron en la familia *Peronosporaceae* (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981). Los hongos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* actualmente se encuadran taxonómicamente dentro de la familia *Pythiaceae* (desde que Schröter en 1897 así lo hiciera), orden *Peronosporales*, clase *Oomycetes* y Subdivisión *Mastigomycotina* dentro de la División *Eumycota* (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; MARTIN,1992), o subclase *Oomycetes* y clase *Phycomycetes* (AGRIOS,1988).Otros autores dan a *Mastigomycotina* la categoría de División (HALL.1993), e incluso se propone la denominación *Oomycota* para la Primera división[4] en contraposición a la Segunda división: *Eumycota* (BRESINSKY,1983).

Aunque considerados como hongos, los oomicetos poseen unas características que no se dan en los "hongos verdaderos", sino que los asemejan más a ciertos grupos de algas. De acuerdo con este hecho, HALL (1993) sugiere que los oomicetos tienen un origen común con las algas y que en un tiempo muy remoto se escindieron del tronco común. De hecho, este mismo autor recoge la clasificación propuesta por CAVALIER-SMITH en 1986 que sitúa a la clase Oomycetes dentro del Phylum Heterokonta en el Reino Chromista.

Las peculiaridades que distinguen a los oomicetos del resto de los hongos verdaderos son las siguientes (BRESINSKY,1983; BRASIER,1992; HALL,1993):

1.-Su pared celular se compone de un 80-90% de polisacáridos, incluyendo microfibrillas de celulosa (los eumicotas carecen de ella), e hidroxiprolina, semejante a las células vegetales.
2.-Su ciclo vital es mayoritariamente diploide (a veces poliploide) ya que la meiosis tiene lugar justo en la fase de producción de los gametos.
3.-La reproducción sexual es oogámica[5].
4.-La membrana del núcleo (carioteca) no se divide durante la mitosis y los nucleolos no se dispersan durante la profase.
5.-La base del flagelo (cinetosoma) presenta una estructura helicoidal.
6.-Las crestas mitocondriales son tubulares, como las de las células vegetales, y no laminares o en forma de disco, como en los hongos verdaderos.
7.-Tanto la biosíntesis de la lisina como la del ácido nicotínico presentan alteraciones respecto a los hongos verdaderos; se asemejan más a los ciclos de las plantas superiores.
8.-El peso molecular del RNA ribosómico es distinto al de los eumicotas.
9.-Los esteroles predominantes son colesterol y fucosterol, también presentes en algas y plantas.

[4] La división Oomycota solo consta de una clase: Oomycetes, dentro de la que se establece el Orden Peronosporales (BRESINSKY,1983).
[5] Oogamia se produce cuando, en la reproducción sexual, son los gametos los que intervienen en la fecundación.

10.-Como sustancias de reserva no acumulan glucógeno, a diferencia de los "hongos verdaderos".

Todos los oomicetos presentan un talo cenocítico y solo desarrollan tabiques eventualmente en tejidos viejos o como separación de los cuerpos fructíferos. Las esporas asexuales son zoosporas biflageladas heterocontas, con uno de los flagelos liso y ligeramente más largo que se proyecta hacia atrás y el otro "plumoso", proyectado hacia delante, con lo que el movimiento de la zoospora se produce por el efecto combinado de ambos (BRESINSKY,1983; HALL,1993). Además, el flagelo puede insertarse en posición lateral o apical (HALL,1993). Precisamente las características del flagelo (número, tipo y posición) son las que sirven para distinguir las tres clases dentro de la División Mastigomycotina (HALL,1993).

La clase *Oomycetes* comprende alrededor de 76 géneros que ocupan nichos ecológicos muy diversos, desde los hábitats acuáticos a los completamente terrestres; pueden encontrarse tanto en el agua dulce como en suelo, como parásitos de otros micetos, parásitos de animales (insectos, peces, crustáceos y mamíferos) o de vegetales superiores (HALL,1993). Las especies más primitivas viven como saprofitos en el agua; las especies más evolucionadas son terrestres y parásitos de plantas superiores (BRESINSKY,1983).

1.5.1 EL GÉNERO *PYTHIUM*

En 1981, VAN DER PLAATS-NITERINK reconocía la existencia de 87 especies distintas dentro del género *Pythium*; aproximadamente diez años después DICK (1990) considera alrededor de 120 especies. No todas las especies de este género son patógenas de plantas, algunas son estrictamente saprofitas, otras son micoparásitas, mientras que otras parasitan insectos o animales superiores (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; MARTIN,1992). Sin embargo, una característica importante de la inmensa mayoría de las especies de *Pythium* es su capacidad de ejercer el "parasitismo facultativo" (MARTIN,1992; HALL,1993). La capacidad patogénica depende en gran medida de la actividad enzimática que el hongo sea capaz de producir, principalmente de la celulolítica y pectolítica. Hay ciertas diferencias en la capacidad enzimática de las distintas especies dentro del género. Por ejemplo, DEACON (1979), citado por VAN DER PLAATS-NITERINK (1981), demostró que *P.irregulare* y *P.intermedium* son capaces de producir celulasas. Además, algunas especies producen fitotoxinas (caso de *P.irregulare*) y factores de crecimiento (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

Las especies de *Pythium* se encuentran distribuidas por todo el mundo, desde zonas tropicales a climas templados e incluso fríos. Son muy abundantes en suelos cultivados y también se detectan, aunque en menor cantidad, en suelos no cultivados y ácidos (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

Morfológicamente, las especies de *Pythium* presentan hifas de 5-7 μm de grosor (diámetro), carentes de tabiques, excepto en cultivos viejos o en los puntos de diferenciación de estructuras de fructificación (MARTIN,1992). La identificación de especies clásica se basa en la comparación de la morfología de sus estructuras reproductoras, tanto sexuales como

asexuales (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; MARTIN,1992). Los esporangios pueden ser de varios tamaños y formas (filamentosos, globosos o esféricos, lobulados o toruloides); las oosporas pueden presentar distintas formas, tamaños, grosor de la pared, ornamentación (lisos, espinosos, etc.) y número (de 1 a 3 es lo normal), y también varía el origen (hipogino, monoclino o diclino) y la inserción (apical, lateral o en forma de campana) del anteridio según la especie considerada (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; MARTIN,1992; HALL,1993). La fecundación es siempre paragina. Los hinchamientos hifales en *Pythium* pueden ser esféricos, limoniformes o encadenados.

La clasificación más reciente, propuesta por DICK (1990), apoyada en la representación por diagramas de Venn, incorpora parámetros morfométricos en su clave, tales como: diámetro del oogonio, diámetro de la oospora, diámetro del ooplasto, grosor de la pared de la oospora, distancia entre el origen del anteridio y el tabique basal del oogonio o el ángulo de inserción del anteridio en el oogonio.

1.5.2 EL GÉNERO *PHYTOPHTHORA*

El primer autor que dio nombre a este género fue DE BARY en 1876. Según recoge BLACKWELL (1949) el nombre proviene del griego "*phyton*" que significa planta, y "*phthora*" que significa destrucción. Hay más de 80 especies descritas dentro del género, pero en la actualidad solo se admiten unas 40 (MITCHELL Y KANNWISCHER-MITCHELL,1992). Nueve especies son saprofitos acuáticos, pero la mayoría de las especies de *Phytophthora* son patógenos de plantas en todo el mundo. Algunas especies son patógenas de unos pocos huéspedes (caso de *P.infestans*) y otras son muy polífagas (como *P.cinnamomi* o *P.palmivora*) (WATERHOUSE,1971).

Morfológicamente, *Phytophthora* posee un micelio relativamente grueso, con hifas de 5 a 8 µm de diámetro, ramificadas en ángulo recto y ligeramente constreñidas en la base y produce haustorios muy pequeños. Ciertas especies presentan una mayor tendencia que otras a formar hinchamientos hifales, que pueden ser intercalares o terminales, e incluso pueden agruparse formando agregados característicos que se usan para su clasificación taxonómica (caso de *P.cinnamomi*) (WATERHOUSE,1970; STAMPS Y COL.,1990; MITCHELL Y KANNWISCHER-MITCHELL,1992).

Otra estructura bastante común entre las especies de *Phytophthora* es la clamidospora. Sirve como espora de resistencia gracias a su pared engrosada, adaptada a la supervivencia en condiciones extremas, y a la acumulación de sustancias de reserva en su interior (BLACKWELL,1949).

Los esporangióforos y esporangios son muy característicos del género. Aunque más sencillos en su estructura que los de los Peronosporáceos, es frecuente que los esporangióforos simples en *Phytophthora* emerjan justo debajo del esporangio anterior o incluso crezcan a través de él. Los esporangios por su parte, son uno de los elementos claves en la taxonomía de las especies del género, ya que el tipo de papila (más o menos conspicua), junto con la posición del anteridio respecto al oogonio, reflejo del tipo de fecundación (anfigina o paragina), sirven para definir los 7 grupos en los que STAMPS Y COL. (1990)

clasifican las especies del género. El esporangio es comúnmente globoso, esférico, ovoide o limoniforme. La germinación del esporangio puede ser directa o indirecta. La germinación directa supone la formación de un tubo germinativo que porta todo el protoplasto multinucleado. Se produce con frecuencia en esporangios viejos que no han producido zoosporas. Mediante la germinación indirecta el esporangio diferencia zoosporas flageladas que libera al medio exterior.

Las oosporas se protegen con una pared doble y en algunas especies pueden llevar algún tipo de ornamentación en su pared, y pueden ser pleróticas o apleróticas.

1.5.3 DIFERENCIASENTRE *PYTHIUM* Y *PHYTOPHTHORA*

En cuanto a su morfología, el micelio de *Phytophthora* es, en general, más grueso y ramificado (con un aspecto menos flexible) que el de *Pythium*, y de crecimiento más lento (BLACKWELL,1949). Las formaciones conocidas como hinchamientos hifales ("hyphal swellings") son distintas en ambos géneros. En *Phytophthora* son crecimientos anormales de las hifas de forma que se engrosan en un punto, son ricos en protoplasma y no están separados del resto de la hifa por ningún tabique (BLACKWELL,1949; HALL,1993). En *Pythium* se conserva el nombre pero se separan de la hifa por un tabique y, en ciertas especies, actúan como auténticas esporas (HALL,1993). Otra diferencia estriba en que las especies de *Phytophthora* son más propensas a producir clamidosporas que las de *Pythium*.

Una de las principales diferencias entre los géneros *Pythium* y *Phytophthora* se basa en el proceso de diferenciación de las zoosporas. *Phytophthora* diferencia las zoosporas en el citoplasma dentro del esporangio, antes de la descarga. *Pythium*, por su parte, produce primero una vesícula fuera del esporangio antes de la formación de las esporas (BLACKWELL,1949; BRASIER,1992).

Existen también ciertas diferencias al nivel de la secuencia del ADN mitocondrial, detectables al utilizar ciertos anticuerpos monoclonales (BRASIER,1992) y en el tipo de fecundación sexual, en *Pythium* solo puede ser paragina (HALL,1993).

Por otra parte, existen también diferencias ecológicas. En general, *Pythium* presenta una mayor habilidad como saprofito y un parasitismo moderado, principalmente en monocotiledoneas; mientras que *Phytophthora* es menos competitivo como saprofito pero más eficaz como patógeno, con preferencia en las dicotiledoneas (BRASIER,1992).

Entre las especies de *Pythium* hay mucha más variabilidad que entre las especies de *Phytophthora*, lo que según BRASIER (1992) sugiere que *Phytophthora* es un género de origen más reciente que *Pythium*. Sin embargo, lógicamente, las diferencias dentro de cada género son mucho menores a las diferencias entre ambos géneros.

1.5.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

Las características morfológicas que diferencian a las tres especies de *Pythium* estudiadas en este trabajo, según VAN DER PLAATS-NITERINK (1981), son las que se refieren a continuación.

Pythium irregulare Buisman

Forma hifas de unas 6 µm de diámetro y esporangios esféricos de 10 a 20 µm de diámetro, terminales e intercalares, pero poco frecuentes. Las zoosporas se producen raramente y se transforman en cistos de 8 µm aproximadamente. Produce también hinchamientos hifales ("hyphal swellings") globosos, limoniformes o irregulares de unas 25 µm y que pueden ser intercalares o terminales (MIDDLETON,1943; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

Los oogonios son irregulares en forma y muy variables en tamaño, con un valor medio de 18,5 µm, generalmente intercalares, aunque en ocasiones en posición terminal. Su superficie a menudo muestra unas proyecciones cónicas o en forma de "dedo" de longitud variable. Esta es una de las principales características que se utilizan para su clasificación taxonómica. De 1 a 3 anteridios por oogonio, preferentemente monoclinos (nacen de la misma hifa que el oogonio) y pedunculados, aunque no es infrecuente encontrar cualquier otra posibilidad. Nunca intercalares y con inserción apical con el oogonio, a menudo encorvados (semejando el mango de un bastón). Las oosporas son aplerótica de un tamaño medio de 15,9 µm y una pared de 1 a 1,5 µm de grosor, aunque ocasionalmente pueden ser pleróticas (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

La temperatura óptima de desarrollo es de 30°C, con un máximo de 35°C y un mínimo de 1°C.

Es una especie muy común en suelos de todo el mundo, es altamente ubicua. La primera referencia se hizo en Holanda, como patógeno en raíces de *Pisum sativum* L., *Lupinus* sp. y semillas de *Cucumis sativa* L. Más tarde ha sido encontrada en ornamentales y coníferas en Estados Unidos, Nueva Zelanda, Argentina y Alemania, entre otros (MIDDLETON,1943; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981). *P.irregulare* es una de las especies de *Pythium* más difundidas como productora de "damping-off" en plantas forestales y otros tipos de plantas (AGRIOS,1988). Por ejemplo, en Argentina fue aislada de *Cupressus lusitanica*, *Gypsophila* sp., *Pinus halepensis*, *Thuja* sp. y *Zinnia* sp. entre otras (FREZZI,1956).

Pythium paroecandrum Drechsler.

Especie muy similar a *P. irregulare*. Las hifas son algo más gruesas que las de *P.irregulare*, alrededor de 9 µm de ancho. Los apresorios son frecuentes en cultivo. Los esporangios son globosos o elipsoidales, mayores que los oogonios, principalmente intercalares, de 12 a 33 µm de diámetro, con tubo de descarga de 4 a 20 µm de longitud[6] y 4 µm de anchura, y que a veces se forma cerca de la hifa (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

[6] Pueden llegar a 100 µm de longitud.

Los oogonios son más regulares y ligeramente mayores que los de *P.irregulare*, miden una media de 19 µm de diámetro, son globosos, fundamentalmente intercalares y con frecuencia encadenados. Carecen de las proyecciones en forma de "dedo" características de *P.irregulare*.

Los anteridios son muy variables. Produce de 1 a 5 anteridios por oogonio, monoclinos principalmente. Sin embargo, en ocasiones son sésiles, diclinos, intercalares o hipoginos. Las oosporas son apleróticas de pared lisa, de diámetro medio de 17 µm ,y con una pared de 1 a 1,5 µm de espesor.

Su óptimo de crecimiento se localiza a los 25ºCelsius, con un mínimo a 5ºC y un máximo a 35ºC (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

P.paroecandrum es también una especie ampliamente distribuída, aunque no muy frecuente. Ha sido aislada de suelo, de agua y de plantas hortícolas, ornamentales, de cereales y de frutales. VAN DER PLAATS-NITERINK (1981) indica que es un patógeno débil en plántulas de diversas plantas, entre ellas pinos y crisantemos.

Pythium intermedium de Bary.

Produce hifas de un grosor medio de 7 µm. No se producen esporangios ni zoosporas. Por el contrario, sí produce hinchamientos hifales ("hyphal swellings") en abundancia, que tienden a formar densas cadenas de longitud variable. Pueden ser terminales o intercalares y se liberan con facilidad. Su tamaño es de 25 µm de diámetro (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

Los oogonios y anteridios solo se forman en cultivos pareados de aislados compatibles (especie heterotálica).

La temperatura óptima se sitúa entre 20 y 25 ºCelsius, la mínima es 5ºC y la máxima es 30ºC (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

P.intermedium es un hongo muy habitual en suelo, aunque también ha sido aislado de restos vegetales y raíces de plantas superiores; incluso ha sido aislado a partir de agua. Ha sido encontrado en ornamentales y olmos en Argentina, pinos y olmos en China, por ejemplo. Se ha comprobado su patogenicidad en ciertas ornamentales tales como pensamientos, pelargonios y geranios, crisantemos y begonias (FREZZI,1956; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

1.6 PATOGENICIDAD Y DIAGNOSIS

Existen referencias anteriores a trabajos dedicados a la detección de las enfermedades que afectan a plantas forestales u ornamentales en su producción en vivero o en fases posteriores de su cultivo, tanto en España (SOLDEVILLA,1995; TUSET E HINAREJOS,1995; HERNÁNDEZ Y COL.,1998) como en otros países (EDMONDS Y HEATHER,1973; DARVAS Y COL.,1978; JAMES,1985; PERRIN Y SAMPANGI,1986; JACQUIN Y CHAUVEL,1993; BARTHOD,1994; MIMAUD,1996; HANSEN Y LEWIS,1997) aunque no son abundantes. En su mayoría se basan en el estudio de grupos de hongos distintos a los pitiáceos (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Armillaria*, *Seiridium*, *Endothia*, etc.), aunque algunos también detectan especies de *Pythium* y *Phytophthora* .

Generalmente, en los estudios sobre hongos aislados de material en vivero o de cultivos la detección de especies de *Pythium* es excepcional, debido a que son difíciles de aislar de suelo o planta afectada si no se recurre a medios de cultivo selectivos (HENDRIX Y CAMPBELL,1968; HENDRIX Y CAMPBELL,1973).

Especies de *Pythium* están citadas como causantes de graves daños, tanto en plantas hortícolas (MOULIN Y COL.,1996) como en forestales (EDMONDS Y HEATHER,1973; VAARTAJA,1975; JAMES,1985; PERRIN Y SAMPANGI,1986; HUANG Y KUHLMAN,1990) y ornamentales (HENDY Y ROBERTS,1974; KOSTER Y DE ROOIJ,1980; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; HAUSBECK Y COL.,1989; CHANG Y COL.,1994; WHITE Y WAKEHAN,1996). En el Reino Unido, los principales causantes de "damping-off" en viveros de árboles forestales y ornamentales son los hongos del género *Pythium*. Las especies más frecuentes son *P.ultimum* y *P.debaryanum* (PHILLIPS Y BURDEKIN,1982). En Estados Unidos, del suelo de viveros forestales afectados por "damping-off" en post-emergencia de plántulas de diversas especies de *Pinus*, han sido aisladas las especies *P.irregulare-P.debaryanum*[7], *P.sylvaticum*, *P.spinosum*, *P.helicoides* y *Phytophthora cinnamomi* (HENDRIX Y CAMPBELL,1968). Aunque *Pythium* es considerado un patógeno de raíces, también puede afectar al tallo y hojas de algunas plantas, e incluso a sus frutos (HENDRIX Y CAMPBELL,1973).

La diagnosis de la enfermedad producida por *Pythium* spp. es altamente complicada ya que los síntomas que la acompañan no son privativos de estos hongos, sino que pueden deberse a otros patógenos, e incluso a causas abióticas.

Dentro del género *Pythium*, hay especies polífagas y otras patógenas de un solo huésped (MARTIN,1992), aunque predomina lo primero (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981). De la misma forma hay especies altamente virulentas y otras débilmente virulentas (MARTIN,1992).

Durante algún tiempo se pensó que *Pythium* era solo un parásito de gravedad menor que solo provocaba enfermedades graves en el cultivo cuando las condiciones del sustrato o las técnicas de cultivo utilizadas eran desfavorables para las plantas. Pero ahora es ampliamente aceptado que *Pythium* es un verdadero parásito, capaz de provocar cuantiosas pérdidas y afectar seriamente a la calidad de las plantas (HENDY Y ROBERTS,1974). De hecho,

[7] *P.debaryanum* se considera parte de un complejo con *P.irregulare*.

se atribuye a las especies patógenas de *Pythium* que producen "damping-off" en semilleros un alto grado de virulencia (FREZZI,1956; EDMONDS Y HEATHER,1973). Por ejemplo, *P.irregulare* es altamente virulento sobre plántulas de judía de semillero (LUMSDEN Y COL.,1976).

1.6.1 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *PYTHIUM*

Clásicamente, a *Pythium* se le atribuía el papel de productor de enfermedad en semillas o plántulas de semillero y a *Phytophthora* las pudriciones en raíz de plantas más adultas (FREZZI,1956; HENDY Y ROBERTS,1974; HANSEN Y COL.,1979; PHILLIPS Y BURDEKIN,1982; PERRIN Y SAMPANGI,1986; COOLEY,1987; AGRIOS.1988; VEGH Y COL.,1994). Pero, más recientemente, se reconoce que *Pythium* es capaz de afectar a plantas adultas, penetrando a través de los pelos absorbentes y los ápices de la raiz, y provocar alteraciones (RONCADORI Y MCCARTER,1971; RAABE Y COL.,1972; WONG Y COL.,1984; MARTIN,1992; MOULIN Y COL.,1994; MOULIN Y COL.,1996; REY Y COL.,1996).

Pythium, como patógeno en semilleros, provoca la enfermedad conocida como "damping-off", en términos anglosajones, cuya traducción al español tiene algunas variantes, como por ejemplo, "ahogamiento de plántulas" (AGRIOS,1988), "caída de plántula" (SOLDEVILLA,1995), "peste de los semilleros" e incluso "mal del pie". Pero, además, es responsable de otras enfermedades como "podredumbre de raíz" y de efectos tales como marchitez, clorosis, defoliación parcial, alteraciones en sistema radicular y escaso o irregular desarrollo (HENDRIX Y CAMPBELL,1966; HENDY Y ROBERTS,1974; JOUSTRA,1983; JAMES,1985).

La enfermedad del "damping-off" puede estar causada por muy diversos agentes. Los síntomas que produce no son específicos de un solo grupo de hongos; por el contrario, pueden estar producidos por un complejo o conjunto de varios hongos, por nemátodos o insectos, e incluso por condiciones físicas del suelo (mal drenaje, por ejemplo) u otras condiciones ambientales. La definición aportada por SOLDEVILLA (1995), citando textualmente a NEERGAARD (1979), es la siguiente: "enfermedad de las semillas y jóvenes plántulas cuyas causas son el decaimiento de la semilla y el colapso del crecimiento en la plántula, usualmente producido por un ataque fúngico". Los agentes fúngicos asociados a esta enfermedad son, principalmente, especies de los géneros *Fusarium, Pythium, Phytophthora, Verticillium* y *Rhizoctonia*[8], aunque también se citan otros, tales como *Cylindrocarpon destructans, Botrytis cinerea, Diplodia pinea* o *Macrophomina phaseolina* (DARVAS Y COL.,1978; PERRIN Y SAMPANGI,1986; AGRIOS,1988; SOLDEVILLA,1995). La enfermedad del "damping-off" se produce en la inmensa mayoría de los viveros de todo el mundo y afecta a multitud de plantas huésped (FREZZI,1956; DARVAS Y COL.,1978; AGRIOS,1988; SOLDEVILLA,1995), siendo una de las enfermedades más graves que afectan a las coníferas (DARVAS Y COL.,1978; PERRIN Y SAMPANGI,1986; HANSEN Y LEWIS,1997) y, en general, a las plantas forestales (LOCK Y COL.,1975; PERRIN Y SAMPANGI,1986; SHARMA Y MOHANAN,1992; SOLDEVILLA,1995). Es comúnmente aceptada la importancia del género *Pythium* como productor de enfermedad en viveros de coníferas en todo el mundo (EDMONDS Y HEATHER,1973; VAARTAJA,1975; DARVAS Y COL.,1978; JAMES,1985; SMITH Y NEELY.1981; PERRIN Y SAMPANGI,1986; HUANG Y KUHLMAN,1990). Hay especies de *Pythium* citadas como patógenas en algunas especies de

[8] Las especies más citadas son *F.oxysporum, R.solani, P. cinnamomi, P.ultimum* y *P.irregulare.*

Cupressus, por ejemplo *P.polymorphon* Sideris y *P.ultimum* Trow sobre *C.horizontalis* y *P.irregulare* Buis. sobre *C.lusitanica* (FREZZI,1956; HERNÁNDEZ Y COL.,1998), aunque las referencias son escasas. Y, generalmente, aunque sin cuantificarlas, los autores destacan las "considerables pérdidas" (EDMONDS Y HEATHER,1973).

En algunas ocasiones *Pythium* se asocia en una relación de sinergismo con otros géneros de "hongos del suelo", principalmente *Fusarium* y *Rhizoctonia*, incrementando con ello los efectos no deseados de la enfermedad, principalmente la mortalidad (CHANG Y COL.,1994).

Los síntomas que manifiesta la enfermedad varían dependiendo de la edad de la planta huésped, de modo que se distinguen dos tipos de "**damping-off**": de **pre-emergencia** y de **post-emergencia**. El primer tipo se da cuando el patógeno afecta a las semillas durante la germinación pero antes de que las plantas emerjan del suelo; entonces el síntoma más claro que produce es fallos o marras en nascencia. El segundo tipo se produce cuando el ataque del patógeno se inicia una vez que las plántulas han emergido; suele localizarse en las raíces, en la zona del cuello de la planta o en los hipocotilos. En este caso el patógeno produce podredumbres en raíz y cuello, necrosis de los tejidos de sostén del tallo al nivel del cuello, interrupción de la circulación de la savia y, como consecuencia, depresión, marchitez y, finalmente, colapso total cuando la planta se dobla a nivel del cuello.

Algunos autores (HENDRIX Y CAMPBELL,1973; DARVAS Y COL.,1978; AGRIOS,1988; SOLDEVILLA,1995) hablan de un tercer tipo de "**damping-off**", el **tardío**, que afecta a las plantas adultas, más lignificadas, actuando principalmente sobre las raicillas absorbentes y limitando su función, de forma que su principal manifestación es las podredumbres en raíz, las lesiones en cuello y la atrofia o retrasos del crecimiento, por deficiencias en la nutrición. Otros autores consideran este tercer tipo como otra enfermedad, la "**podredumbre de raíz**" o "root rot" (PHILLIPS Y BURDEKIN,1982; PERRIN Y SAMPANGI,1986).

Por otra parte, hay autores (SALT,1979; HODGES Y COLEMAN,1985; STANGHELLINI Y KRONLAND,1986; FAVRIN Y COL.,1988; REY Y COL.,1996) que hacen referencia a una enfermedad "subclínica" producida por algunas especies de *Pythium*, las cuales, además de poder actuar de la forma referida en el párrafo anterior, bajo ciertas condiciones son capaces de colonizar al huésped y provocar retrasos en el crecimiento, alteraciones estructurales en raíz y cuantiosas pérdidas en el rendimiento sin provocar necrosis de tejidos ni síntomas aparentes en parte aérea ni en sistema radicular. No es extraño encontrar referencias a que los patógenos del género *Pythium* se recuperan también de las raíces de algunas plántulas asintomáticas (ABAD Y COL.,1994).

Pythium es capaz de invadir otros órganos carnosos, tales como frutos caídos o en contacto con el suelo, en condiciones de humedad elevada (AGRIOS,1988). Los pitiáceos no han sido aislados a partir de la semilla, es decir parece que no se transportan con ella, aunque existe evidencia indirecta de que pudiera esta ser una forma de transmisión de la enfermedad (PHILLIPS Y BURDEKIN,1982).

Los daños en las partes tiernas de las raíces del vegetal y los retrasos en el crecimiento se especula que puedan deberse a varias causas, recogidas por STANGHELLINI Y KRONLAND (1986):

1.-El hongo acelera el proceso de maduración y senescencia de los tejidos de las raicillas.
2.-*Pythium* afecta a la absorción del agua por parte de las raicillas absorbentes colonizadas y a su translocación por el vegetal.
3.-La circulación de los minerales y nutrientes y la producción de hormonas en la raíz se altera.

1.6.2 CICLO DE LA ENFERMEDAD

Pythium persiste en el suelo gracias a su actividad saprofítica y a las esporas de resistencia. Las especies de *Pythium* no son competidores agresivos para otros microorganismos del suelo; solo cuando las condiciones ambientales son desfavorables para los competidores o estos se hallan ausentes, son capaces de rivalizar con éxito. La capacidad de desarrollarse como saprofito es importante para la supervivencia de *Pythium* porque el hongo es capaz de colonizar nuevos sustratos aún no explorados por otros (HENDRÍX Y CAMPBELL,1973). Esta misma capacidad de funcionar como saprofito y de colonizar sustratos orgánicos frescos puede tener importantes implicaciones en cuanto a la capacidad de supervivencia a largo plazo; para muchos *Pythium* patógenos esta puede ser una vía para aumentar el inóculo inicial (MARTIN,1992). La actividad saprofítica de *Pythium* se ve favorecida por la elevada humedad en suelo y el escaso intercambio gaseoso en suelo (HENDRIX Y CAMPBELL,1973).

Las estructuras de resistencia constituyen una vía de propagación más importante que la anterior. Fundamentalmente, la persistencia en el espacio se realiza a través de esporangios y zoosporas (esporas asexuales) y la persistencia en el tiempo a partir de oosporas (esporas sexuales) (HENDRIX Y CAMPBELL,1973). VAN DER PLAATS-NITERINK (1981) recoge los trabajos de numerosos autores que cifran la supervivencia de las oosporas en suelo de 8 meses a 12 años. Sin embargo también hay citas referidas a la capacidad de los esporangios de *Pythium* como estructuras de resistencia en suelo, capaces de sobrevivir durante 11 meses (STANGHELLINI Y HANCOCK,1971).

Al darse las condiciones favorables las estructuras de resistencia germinan[9], emitiendo un tubo germinal, o bien el micelio invernante se desarrolla y produce esporangios y zoosporas, que se dirigen al encuentro de los tejidos del huésped. Esta aproximación puede efectuarse al azar o deberse a un movimiento quimiotrópico estimulado por los exudados radiculares. Dichos exudados parecen tener también una función nutritiva, puesto que las oosporas requieren de carbohidratos para la formación del tubo germinal (VAARTAJA Y AGNIHOTRI,1968; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; NELSON Y HSU,1994). Una vez en contacto con el huésped el hongo penetra en él, tanto por acción mecánica como química (hidrolizando compuestos de las paredes celulares), y parasita las células del parénquima y de los tejidos de sostén alrededor de los vasos mediante las enzimas pectinolíticas que secreta y que destruyen la lámina media que une a las células, con la consiguiente desintegración de los tejidos (AGRIOS,1988). *Pythium* produce enfermedad del tipo "no traqueal" (o "no vascular"), con lo que no penetra en los vasos, pero crece alrededor de las células y a través de ellas. Las enzimas celulolíticas y proteolíticas degradan las células hasta su total destrucción y así el

[9] Para que la oospora pueda germinar primero debe estar madura y además, normalmente, es necesario que se someta a un período de dormancia.

hongo se alimenta de sus contenidos. Los tejidos afectados no son capaces de sostener a la plántula y ésta se dobla por la zona afectada (que suele ser el cuello) y muere por falta de nutrientes y por la posterior progresión de la enfermedad.

Si la infección inicial se produce en planta de mayor edad, cuando los tejidos se han lignificado y son menos sensibles, o bien si las condiciones ambientales dejan de ser favorables al patógeno, la colonización del hongo se paraliza en la zona de infección y la planta es capaz de recuperarse y emitir nuevas raicillas por encima del punto de ataque.

Durante la colonización el hongo progresa dentro de la planta produciendo micelio, pero también forma hacia el exterior esporangios y zoosporas, que se desplazan en la lámina de agua para propagar la infección a otras plantas próximas, y oosporas dentro del huésped para conservar el inóculo durante el período desfavorable.

1.6.3 TOLERANCIA DE LA PLANTA

La planta, por su parte, en ciertas ocasiones es capaz de reaccionar y desarrollar una secuencia de mecanismos de defensa en los tejidos de la raíz afectados que repelen el ataque del patógeno. Son, principalmente, barreras físicas (REY Y COL.,1996).

La reacción de la planta frente a la infección puede variar con la especie vegetal considerada, la constitución genética del cultivar (CHAGNON Y BELANGER,1991), el método de inoculación, la concentración de inóculo, la virulencia de los aislados y las condiciones ambientales (CHANG Y COL.,1994).

Los medios de resistencia que la planta genera ante la agresión debida a un patógeno son aún poco conocidos. Sirvan como muestra los trabajos de HANCOCK Y HUISMAN (1981) que subrayan el papel del apoplasto como una de las principales fuentes de nutrientes de los parásitos, de modo que su influencia en la relación huésped-parásito parece ser de gran trascendencia. El huésped puede aprovechar este hecho y responder a la infección mediante el bloqueo de dicha vía de suministro de alimento y agua. Algunos ejemplos apuntados por los autores se refieren a la reducción de la permeabilidad de las membranas celulares (con lo que se reduce el paso de nutrientes del simplasto al apoplasto), a la alteración de los sistemas de transporte en el plasmalema, o al taponamiento de los espacios entre las paredes celulares con sustancias impermeables al agua, tales como lignina, melanina o silicona. Con estos cambios localizados en los tejidos que rodean los puntos de infección, el vegetal puede conseguir aislar o, cuanto menos, frenar el proceso de colonización.

1.7 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad es la consecuencia de las interacciones entre la planta huésped, el hongo patógeno y el ambiente. Un cambio en cualquiera de los factores puede influir en la expresión de la enfermedad y su gravedad.

Los viveros son ecosistemas muy modificados y simplificados con respecto al ambiente natural de las plantas que se cultivan en ellos, y demandan una gran cantidad de energía y un suministro continuo de recursos para mantener su equilibrio inestable. Las mismas condiciones que son favorables para este cultivo intensivo de plantas (alta densidad de plantación, condiciones de temperatura y humedad controladas, fertilización, técnicas de cultivo, etc.), muy especialmente si se trata de cultivo protegido, son también las más apropiadas para el desarrollo y la propagación de plagas y enfermedades (PAWUK,1979; FAVRIN Y COL.,1988; HANSEN Y LEWIS,1997).

Los principales factores que influyen en la infección son los siguientes: concentración de inóculo, temperatura y humedad del suelo, pH, composición de los cationes, intensidad luminosa y presencia y número de otros microorganismos (HENDRIX Y CAMPBELL,1973; SHARMA Y MOHANAN,1992). Pero no debemos olvidar otro elemento fundamental como es la receptividad del huésped, y dentro de dicho concepto el estado sanitario (ausencia o presencia de cualquier tipo de estrés) y la edad de la planta intervienen de manera trascendental (BLOOMBERG,1985). En general, son favorables a la enfermedad producida por especies patógenas de *Pythium* las temperaturas frescas, la humedad elevada (ya sea debido a lluvia o a riego intenso) y el estado de debilidad de la planta sometida a estrés (trasplante, estaquillado) (SMITH Y NEELY,1981; AGRIOS,1988) o en las primeras etapas de su desarrollo (semillero).

Los porcentajes de infección aumentan en proporción directa al incremento en concentración de inóculo (BHATTI Y KRAFT,1992), pero esta relación decrece a medida que aumenta la concentración de inóculo (MITCHELL,1978). Si la concentración de inóculo es elevada, la infección de las semillas se produce más rápidamente que si la concentración es baja (XI Y COL.,1995). La explicación que ofrecen XI Y COL. (1995) es que la probabilidad de interacción entre el patógeno y el huésped es mayor cuando hay mayor cantidad de patógeno en la rizosfera. Por tanto, en el caso de concentraciones bajas de inóculo, habrá menos puntos de penetración en la planta, con lo que también se hace más difícil su recuperación a partir de los tejidos del huésped.

La temperatura tiene tanto efecto en el desarrollo de la enfermedad como la humedad del suelo. Las especies de *Pythium* que no producen zoosporas fácilmente responden más a la temperatura que a la humedad del suelo o sustrato y viceversa (HENDRIX Y CAMPBELL,1973). No hay reglas fijas: distintas especies del patógeno tienen diferentes exigencias a este respecto (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981; MARTIN,1992; HENDRIX Y CAMPBELL,1973). Algunas especies de *Pythium* infectan más y mejor a temperaturas bajas y otras a temperaturas más altas. Por ejemplo, *P.ultimum* produce graves daños a 17°C pero produce pocos daños por encima de los 26°C (MOORMAN,1986). *P.irregulare* provocó mucha mayor mortalidad en plantas ornamentales (*Dizygotheca elegantissima*) a 15,5°C frente a la escasa mortalidad causada a 23°C (KEIM Y COL.,1978). Las temperaturas óptimas para la infección oscilan entre

los 15 y 22°C para *Pythium irregulare* Buisman y los 28°C para *Pythium paroecandrum* Drechsler (RONCADORI Y MCCARTER,1971; KEIM Y COL.,1978; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981). Con *Pythium aphanidermatum*, *P.irregulare* y *P.paroecandrum* en campo se ha encontrado que cuando la temperatura del aire es alta, las poblaciones del hongo en suelo son bajas (LUMSDEN Y COL.,1976). Pero no se debe generalizar porque también aparecen excepciones dependiendo del huésped (HENDRIX Y CAMPBELL,1973).

La temperatura obviamente influye en la concentración de propágulos del patógeno en suelo, al influir en la actividad del hongo, que es más acusada durante las estaciones climáticas de temperaturas más templadas (EDMONDS Y HEATHER,1973). Por ejemplo, la inoculación con oosporas de *P.irregulare* produjo una importante reducción en la altura de plantas de soja a 20°C (SOUTHERN Y COL.,1976). La recuperación del patógeno a partir del suelo fue máxima a 20°C y generalmente descendía cuando se incrementaba la temperatura (SOUTHERN Y COL.,1976). Parece también que la temperatura modifica la colonización de las raíces por parte del hongo, de modo que, cuando las condiciones son desfavorables para el huésped (por ejemplo, temperatura ambiente inadecuada o cambios fisiológicos que la hacen más susceptible) se ha comprobado que el nivel de colonización de las raíces se eleva considerablemente (REY Y COL.,1996).

Es generalmente reconocido el hecho de que la humedad del suelo elevada es necesaria para el desarrollo de la enfermedad producida por especies de *Pythium* (HENDRIX Y CAMPBELL,1973). La humedad del suelo actúa como solvente y portador de los nutrientes exógenos y de los exudados radiculares. La máxima germinación de oosporas se da a 95-96% de la capacidad de campo (SOUTHERN Y COL.,1976). La podredumbre de raíz se observó con más frecuencia en semilleros de árboles forestales mal drenados o en plantas transplantadas que habían sufrido un recorte previo en las raíces (HANSEN Y COL.,1979). Pero, atención, aunque las enfermedades producidas por *Pythium* con frecuencia se asocian con condiciones de elevada humedad en suelo, un exceso mantenido durante largo tiempo puede también suprimir el desarrollo de la enfermedad (MARTIN,1992). KENERLEY Y COL. (1984) estudiaron el efecto del suelo saturado sobre la enfermedad producida por *Phytophthora cinnamomi* en plántulas de abeto y sugerían que el incremento de la mortalidad se producía preferentemente al promover la producción y dispersión del inóculo, y no tanto por predisponer al huésped.

WONG Y COL. (1984) estudiaron los efectos de la temperatura y la humedad del suelo sobre la patogenicidad de algunos hongos productores de podredumbres de raíz en trébol subterráneo en Australia, entre ellos *P.irregulare*, y concluyeron que ambos factores pueden afectar significativamente a la expresión de la enfermedad "podredumbre de raíz". Encontraron que la incidencia más grave se daba a temperaturas frescas (10 - 15 °C) y humedad en suelo elevada (65% de la capacidad de campo). *P.irregulare* era menos virulento a temperaturas superiores (con un mínimo a 20°C). Los autores apuntan a la posibilidad de que las temperaturas más bajas son más favorables para el huésped que las más elevadas, y que el patógeno podría aprovechar esta debilidad de la planta sometida a temperaturas desfavorables. Como era de esperar humedades del suelo inferiores (45%) eran menos favorables. Pero sorprendentemente la menor incidencia se daba cuando el suelo estaba saturado. La explicación puede estar en que *P.irregulare* no produce zoosporas con facilidad, por lo que no se beneficia en gran medida de las condiciones de humedad a saturación (lámina de agua para que las zoosporas naden). RISTAINO (1991) encontró que la enfermedad

producida por *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento progresaba más rápidamente en aquellas zonas en las que la precipitación era más elevada.

La interacción huésped-patógeno está muy condicionada por la temperatura (XI Y COL.,1995). Además, la temperatura puede ejercer un efecto decisivo sobre el comportamiento de la planta huésped y en la micoflora del suelo que, sin duda, influyen en la incidencia de la enfermedad (MARTIN,1992).

La producción de oosporas también depende de varios factores, siendo uno de los principales la temperatura. La temperatura ideal es algo inferior a la óptima para el crecimiento del micelio y algo superior a la adecuada para la producción de esporangios (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981). La germinación de las oosporas depende de la humedad, del pH y de la temperatura. La temperatura más favorable es similar a la requerida para el crecimiento vegetativo. Las bajas temperaturas, así como la escasez de nutrientes favorecen la germinación de oosporas produciendo esporangios y zoosporas (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981).

Ensayos realizados en viveros de *Eucalyptus grandis* demostraron que las plantas cultivadas en condiciones de luz reducida, alto contenido de agua en suelo y temperaturas frescas, tanto en suelo como en el aire, soportaban una elevada incidencia de "damping-off" y que las supervivientes presentaban un crecimiento peor[10] (SHARMA Y MOHANAN,1992).

Las características del suelo ejercen también cierto efecto sobre la enfermedad producida por *Pythium*. Por ejemplo, la influencia de la textura del suelo se ha observado en los hongos *P.arrhenomanes* y *P.aristosporum* que son patógenos de raíces secundarias de *Agrostis palustris* (componente de los céspedes) en medio con un alto contenido en arena (>60%) (HODGES Y COLEMAN,1985). Los autores señalan que la enfermedad se produce también en medios con menor contenido en arena pero parece preferir los arenosos. La explicación que apuntan los autores a este hecho observado por ellos y por otros investigadores sobre cereales se refiere a la falta de competencia por parte de otros microorganismos cuando esporas de *Pythium* llegan al sustrato arenoso que carece de población microbiana establecida, lo que deriva en una completa hegemonía por parte de *Pythium*. Otros autores refieren la elevada virulencia de *P.irregulare*, entre otras especies, sobre pepino cultivado en un sustrato mezcla de arena y turba (MOULIN Y COL.,1996). Por el contrario, hay otros que han obtenido un resultado algo distinto, como es la detección de una mayor concentración de patógeno en suelos francos frente a la detectada en los arenosos, aunque nada dicen acerca de su virulencia (EDMONDS Y HEATHER,1973).

No parece existir duda, sin embargo, sobre que los síntomas de "damping-off" varían con la edad y estado de desarrollo del huésped (AGRIOS,1988; MOULIN Y COL.,1996). Las plántulas o las plantas jóvenes son más susceptibles a los ataques de *Pythium* que las plantas adultas (REY Y COL.,1996). Por ejemplo, las estaquillas son especialmente sensibles al ataque de hongos patógenos (SMITH Y NEELY,1981). El momento en que la infección tiene lugar es muy importante. Cuanto más temprana es la infección, más graves serán las consecuencias de la enfermedad (HENDY Y ROBERTS,1974).

[10] Medido como el ratio longitud de tallo:longitud de raíz.

A medida que crecen, los tejidos del vegetal se lignifican. Los tejidos lignificados y bien desarrollados presentan una resistencia considerable a la acción mecánica y enzimática del hongo debido al grosor y estructura de las paredes celulares. Entonces el hongo solo es capaz de producir lesiones pequeñas (AGRIOS,1988). No obstante, las finas raicillas absorbentes pueden ser atacadas en casi cualquier etapa del desarrollo de la planta, porque todas las plantas necesitan de estas zonas no lignificadas de absorción y de crecimiento activo, con tejidos tiernos y vulnerables (AGRIOS,1988). La severidad de los síntomas normalmente disminuye cuando la planta crece y madura (RONCADORI Y MCCARTER,1971).

La mayor tolerancia a la enfermedad que presentan las plántulas de mayor edad puede deberse a aspectos anatómicos o fisiológicos. MELLANO ET AL. (1970) llegan a la conclusión de que son predominantemente estos últimos los que rigen la interacción huésped-patógeno y dan menos importancia a la lignificación de las paredes celulares. Según ellos, en las plantas adultas se produce un efecto de inhibición del hongo una vez que este ha penetrado en la raíz, pero el hongo no muere, solo se inactiva, y es capaz de esporular.

Parece claro que la respuesta del huésped se ve muy condicionada por los factores de estrés. Está demostrado que, cuando actúan como patógenos "menores" ("minor pathogens"), algunas especies de *Pythium* son capaces de producir daños importantes en cultivos hidropónicos cuando las plantas están sometidas a períodos de estrés (REY Y COL.,1996). En algodón, la expresión de los síntomas de la enfermedad depende del estrés que las bajas temperaturas producen en el huésped; es decir, cuando el huésped sufre una alteración ambiental que lo debilita, se vuelve más susceptible al ataque de los patógenos presentes de modo que aparecen los síntomas de la enfermedad provocada por *Pythium* (RONCADORI Y MCCARTER,1971). El estrés producido en plantas de crisantemo cultivadas en hidroponía y sometidas a elevada salinidad (altos niveles de cloruro sódico en el agua) favoreció el ataque de *Phytophthora cryptogea*, al aumentar el número de cistos adheridos a las raíces y favorecer su germinación y penetración en los tejidos de la zona de los pelos radicales (MACDONALD,1982).

La disponibilidad de nutrientes en al suelo también incide sobre la enfermedad. La mortalidad de plantas de poinsetia inoculadas incrementó rápidamente a medida que aumentaba la concentración de sales solubles, asociada al nivel de fertilización. Las plantas que sobrevivieron a la inoculación eran más cortas que las no inoculadas, excepto para el nivel de fertilización más alto. Por tanto, altos niveles de fertilizantes aplicados en fases tempranas de la producción de poinsetias suponen un riesgo muy alto de serias pérdidas causadas por podredumbres de raíz debidas a *Pythium ultimum* (MOORMAN,1986). La mortalidad de plantas estaba directamente correlacionada con la concentración de sales solubles. Este problema ha sido estudiado en sustratos para plantas en maceta y suelo, encontrando que la posibilidad de exceso de sales, y por consiguiente de producción de plantas más débiles y de inferior calidad, es mayor en los primeros, y por tanto el riesgo de enfermedad también es superior (MOORMAN,1986). No obstante, el mismo autor encontró que altos niveles de fertilización no predisponían a plantas de poinsetia de mayor edad (1 año) a la podredumbre de raíz producida por *Pythium*, dando nueva prueba de la repercusión de la edad del huésped sobre la enfermedad.

Efectos similares se han observado en otros patógenos, concretamente en *Fusarium* la disponibilidad de los nutrientes también afecta a la patogenicidad (EDMONDS Y

HEATHER,1973). En *Pythium* se observó un aumento de la podredumbre de raíz a continuación de un aporte de fertilizantes y de materia orgánica (MELLANO Y COL.,1970).

Otra explicación del efecto de los nutrientes pudiera basarse en que los esporangios de *Pythium* necesitan para su germinación de nutrientes aportados externamente por los exudados de las raíces de la planta-huésped. Los exudados de las semillas influyen en la enfermedad del "damping-off" al estimular el crecimiento del patógeno y así aumentar el número de propágulos infectivos por unidad de superficie del huésped. Se cree que dicha estimulación de la enfermedad se debe a que los exudados suprimen los efectos inhibitorios y líticos de las sustancias inhibidoras, o bien, que sirven de nutriente durante la fase inicial saprófita de los patógenos (AGNIHOTRI Y VAARTAJA,1970).

La multiplicidad de factores ambientales que son susceptibles de condicionar el desarrollo de una enfermedad es tanta que controlarlos a todos es imposible. De hecho aún desconocemos la forma de actuar de muchos de ellos e incluso posiblemente ignoremos otros tantos. De algunos de ellos solo tenemos indicios de su influencia pero no conocemos su mecanismo de actuación. Por ejemplo, el pH del suelo parece influir en la germinación de las oosporas de *Pythium aphanidermatum* (LUMSDEN Y COL.,1976) pero no hay estudios concluyentes que permitan hacer recomendaciones al respecto. Sobre estos aspectos son pocas las referencias encontradas y con resultados dispares. Por un lado, se habla de la preferencia de *Pythium* por los suelos neutros o alcalinos (PERRIN Y SAMPANGI,1986). Por el contrario, según PHILLIPS Y BURDEKIN (1982), citando a RAM REDDY Y COL. (1964), especies como *P.irregulare* y *P.mammilatum* causan daño preferentemente en suelos ácidos.

La conclusión práctica más relevante a la vista de todos estos conocimientos es que sería provechoso para el control del patógeno la correcta utilización de las prácticas culturales y de las condiciones ambientales del cultivo. De hecho, sirva como ejemplo el caso de Islandia, en donde mantienen bajo control las enfermedades producidas por *Pythium* en plantas ornamentales de cultivo protegido (invernadero) en vivero, manejando correctamente el riego, la temperatura, la fertilización, etc. (T. BENEDIKZ, com. personal).

1.8 CONTROL QUÍMICO.

Múltiples técnicas se han utilizado para el control de las enfermedades producidas por *Pythium*: productos químicos, radiación ultravioleta o microorganismos, entre otros (MOULIN Y COL.,1996). Pero entre todas ellas, hasta el momento, la más utilizada y con mejores resultados es la primera, las aplicaciones de productos fungicidas químicos.

Una característica de los oomicetos de especial relevancia para los fitopatólogos es que la mayoría de los fungicidas utilizados en el control de las micosis no son efectivos contra ellos[11]. Para su control hay que recurrir a unos grupos especiales de compuestos químicos, como el metalaxil, fosetil-aluminio, propamocarb, zineb o dimetomorf (JAMART Y COL.,1983; HALL,1993; LAFFRANQUE Y COL.,1993; COHEN Y COL.,1995; SOLER Y COL.,1997). Además, los oomicetos en general, y por tanto, los pitiáceos en particular, son muy sensibles a los metales pesados, especialmente al cobre que es altamente tóxico para ellos (HALL,1993).

Una cierta revolución en el control de las enfermedades producidas por los oomicetos se produjo en los años 70 cuando se descubrieron los productos sistémicos con actividad contra dichos patógenos (COHEN Y COFFEY,1986). Los fungicidas sistémicos son agentes químicos muy eficaces para el control de la inmensa mayoría de las enfermedades fúngicas y, naturalmente, de las producidas por los oomicetos. Los productos sistémicos poseen unas características estructurales que los capacitan para moverse dentro del vegetal. EDGINGTON (1981) recoge los tres patrones de movimiento posibles: vía apoplasto, vía simplasto o en ambas direcciones. El simplasto comprende las partes de la planta incluidas dentro de membranas, incluyendo el floema, y se trata de un movimiento descendente ligado al transporte de los productos de la fotosíntesis. El apoplasto incluye las paredes celulares, la cutícula y el xilema, y comprende el movimiento ascendente relacionado con la transpiración (HANCOCK Y HUISMAN,1981). Pues bien, el modo de translocación en la planta del fungicida condiciona su método de aplicación (aplicación foliar o aplicación al suelo).

Los cuatro grandes grupos de fungicidas sistémicos eficaces contra oomicetos son: carbamatos, ciano-omidas (cimoxanilo), fenilamidas (acilanilidas) y fosfonatos. De los carbamatos, el más conocido y utilizado en nuestra región es el propamocarb, que es frecuentemente aplicado al suelo de semilleros como preventivo y curativo, pero hay que aplicarlo en grandes concentraciones para que sea efectivo. El cimoxanilo ha sido poco utilizado para el control de *Pythium,* en parte porque se degrada muy rápidamente tanto en suelo como en planta. Se utiliza preferentemente en mezclas con otros fungicidas como cobre, mancozeb, zineb, folpet, metiram o propineb (DE LIÑÁN,1996).

Las acilanilidas constituyen un grupo muy importante, posiblemente el más utilizado para el control de las enfermedades producidas por los pitiáceos en los semilleros. El más eficaz, y por ello el más conocido, es el metalaxil (KOSTER Y DE ROOIJ,1980; COHEN Y COFFEY,1986; COOLEY,1987). El metalaxil combina dos excelentes características para un fungicida de aplicación al suelo, como son: su gran estabilidad en suelo (mantiene el efecto tóxico durante mucho tiempo) y su elevada movilidad (coeficiente de adsorción bajo). El

[11] Precisamente debido a las diferencias morfológicas y fisiológicas entre este grupo y los "hongos verdaderos" citadas con anterioridad.

modo de acción de este compuesto parece estar relacionado con la inhibición de la síntesis del ARN, probablemente inhibiendo la RNA-polimerasa. El metalaxil es un fungicida muy eficaz para el control de los géneros *Pythium* y *Phytophthora.*

Uno de los productos más usados por los productores de plantas ornamentales desde su creación en 1977, que ha venido a sustituir en las preferencias del usuario al metalaxil, y en concreto, recomendado especialmente contra Pitiáceos en *Cupressus* ornamental, ha sido el fosfonato "tri-etil-fosfonato de aluminio" (fosetil-Al). Se trata de un fungicida sistémico con dos características peculiares que lo diferencian de los demás.

En primer lugar, se transloca por la planta aprovechando las dos vías mencionadas con anterioridad: el simplasto y el apoplasto. Por tanto, el tratamiento puede aplicarse tanto a la parte aérea del vegetal como al suelo, en la zona próxima al cuello, o inyectarlo en el tronco, en la seguridad de que el producto llegará a todas las partes de la planta (COFFEY Y JOSEPH,1985).

La segunda característica diferenciadora reside en su modo de acción. Por un lado, la materia activa promueve alteraciones en la fisiología de la planta de modo que ésta aumenta su resistencia frente al patógeno, en concreto por activación de las fitoalexinas (EDGINGTON,1981). Las pruebas *in vitro* han señalado que el fosetil-Al tiene muy poca actividad contra *Pythium* y *Phytophthora* en esas condiciones y esto llevó a algunos investigadores a considerar que el fungicida carecía de efectos tóxicos directos sobre el hongo (DE WAARD Y VAN ROOIJEN,1978; EDGINGTON,1981). Sin embargo, el fosetil-Al se degrada rápidamente en suelo[12] y en los tejidos vegetales, con formación de etanol y, posteriormente, liberando anhídrido carbónico y ácido fosforoso, siendo este último el metabolito activo contra los patógenos (SOLER Y COL.,1997). Basándose en esto, y en la posibilidad de producir cepas resistentes en el laboratorio, otros autores han llevado a cabo pruebas, tanto con el fosetil-Al como con el ácido fosforoso, llegando a la conclusión de que ambos compuestos tienen modos de acción similares y que actúan también directamente como tóxicos contra los oomicetos, siendo éste su principal modo de acción (BOWER Y COFFEY,1985; FENN Y COFFEY,1985; COHEN Y COFFEY,1986). Por otra parte, también parece que el fungicida favorece la asociación simbiótica de las plantas con las micorrizas vesículo-arbusculares (COHEN Y COFFEY,1986).

El modo de acción directo de este grupo de fungicidas está relacionado con la esporulación del hongo. El fosetil-Al es un potente inhibidor de la formación de esporangios y la liberación de las zoosporas. También reduce la producción de clamidosporas, oosporas, así como la germinación directa de las esporas formadas (COHEN Y COFFEY,1986). El ácido fosforoso es un poderoso inhibidor del crecimiento miceliar, pero no así el fosetil-Al (COHEN Y COFFEY,1986). El catión Al^{3+} no penetra en el huésped pero se ha demostrado que tiene actividad sobre la germinación de las zoosporas (SOLER Y COL.,1997). El fosetil-Al altera los sistemas de transporte de la pared celular del hongo y el metabolismo energético (disminuye la respiración y la producción de ATP) (SOLER Y COL.,1997). El modo de acción indirecto consiste en la inducción de variaciones fisiológicas en el huésped y estimula la producción de sustancias que impiden el desarrollo del hongo. Se detectan en la planta reacciones de hipersensibilidad y micronecrosis celulares (SOLER Y COL.,1997).

[12]Al cabo de 4 días desde la aplicación no es posible detectarlo. Tiene una vida media de horas.

Hemos hecho referencia en un párrafo anterior a la extrema rapidez con que se degrada el fosetil-Al en el suelo. No obstante, su principal producto de degradación, el ácido fosforoso, mantiene su capacidad protectora durante varios meses (HANSEN Y LEWIS,1997). Otra gran ventaja que presenta el fosetil-Al es que posee una gran actividad residual en la planta, por lo que puede usarse con menos frecuencia que otro tipo de fungicidas (COHEN Y COFFEY,1986). Ofrece protección tanto preventiva como curativa (SOLER Y COL.,1997).

Recientemente ha aparecido una nueva materia activa contra los oomicetos: el dimetomorf. Su modo de acción es distinto a los demás grupos; inhibe la síntesis de las paredes de las células en crecimiento del hongo (LAFFRANQUE Y COL.,1993). Actúa por tanto en todas las fases del desarrollo del patógeno, desde la germinación y la penetración hasta la formación de haustorios o la colonización. Penetra muy rápidamente en el vegetal a través de las hojas. Cuando penetra por las raíces se desplaza dentro de la planta a través del apoplasto, aunque su sistemia es muy limitada; sin embargo, posee una actividad residual muy prolongada (COHEN Y COL.,1995). Es activo contra cepas del hongo resistentes a las fenilamidas y aún no hay descritas resistencias al producto. Está citado como activo frente a varias especies de *Phytophthora* y de mildius, pero no específicamente contra *Pythium* (LAFFRANQUE Y COL.,1993; COHEN Y COL.,1995).

El uso de fungicidas tiene dos efectos potenciales no deseables. De una parte, el hongo no es eliminado de la secuencia de propagación por el fungicida, es simplemente inhabilitado, y su presencia y diagnóstico se hace más difícil. Por otra parte, algunos fungicidas (por ej. metalaxil) ejercen una selección en favor de las cepas resistentes del patógeno. Hay citados bastantes casos de resistencia de *Phytophthora* a metalaxil (COHEN Y COFFEY,1986; DUNCAN,1990; GOODWIN Y MCGRATH,1995). A pesar de estar considerado el fosetil-Al como un compuesto poco proclive a la aparición de resistencias, ya hay algunas referencias relativas este fenómeno (COHEN Y SAMOUCHA,1984; BLOOMBERG,1985; DOLAN Y COFFEY,1985; FENN Y COFFEY,1985; HANSEN Y LEWIS,1997). BOWER Y COFFEY (1985) advertían de dicha posibilidad cuando consiguieron cepas de *Phytophthora capsici* "in vivo" altamente tolerantes al fungicida. No hay resistencia cruzada entre el metalaxil y el fosetil-Al (BOWER Y COFFEY,1985), pero sí entre el metalaxil y otros compuestos de su mismo grupo (COHEN Y COFFEY,1986).

La sensibilidad del patógeno frente al fungicida puede variar perceptiblemente según la especie fúngica de que se trate. Pero, lo que es más, el nivel de resistencia frente a un fungicida que presentan diferentes aislados dentro de una misma especie del hongo patógeno varía considerablemente, por lo que se cree que en una población fúngica pueden coexistir más de un mecanismo de resistencia (COHEN Y COFFEY,1986).

Otro punto importante a tener en cuenta en cuanto al uso de fungicidas químicos es el posible riesgo de fitotoxicidad del producto. Este riesgo es aún más evidente y grave en el caso de las plantas ornamentales por varias razones. La más patente e inmediata es que el propio carácter de "ornamental" hace que la tolerancia frente a desviaciones respecto a los cánones de belleza de la especie vegetal sea mínima y, en muchas ocasiones, nula (tolerancia "cero"). Por otra parte, dentro de la denominación "plantas ornamentales" se engloban multitud de géneros y especies vegetales distintos con muy diversos requerimientos, cuya tolerancia a los fungicidas, en la inmensa mayoría de los casos, no ha sido estudiada. Por ello,

generalmente, a la hora de aplicar un tratamiento fitosanitario a una planta o, tanto peor, a un grupo de plantas ornamentales, el resultado es incierto, salvo tratándose de productos muy conocidos y con experiencia previa sobre la/s especie/s y las condiciones culturales de que se trate. Pocas referencias hemos encontrado sobre este asunto. Por ejemplo, en *Petunia* se ha observado una ligera clorosis temporal debido a fitotoxicidad por un fungicida (Drazoxolon) contra *Pythium* (HENDY Y ROBERTS.1974), en *Saintpaulia* se han detectado con los fungicidas etridiazol y piroxiclor (DE WAARD Y VAN ROOIJEN,1978) y en *Rosa, Tilia* y *Acer* con fosetil-Al aunque muy débilmente (JOUSTRA,1983).

El Sector ornamental tiene pocas materias activas que sean eficaces contra los oomicetos (EDGINGTON,1981; COOLEY,1987; HALL,1993; COHEN Y COL.,1995). El abuso de algunos productos ha provocado la aparición de resistencias a algunas moléculas altamente efectivas, aumento que continuará a menos que los productores usen los fungicidas solo cuando sean realmente necesarios (FERRIN Y WADSWORTH,1992; WAARD,1993; VEGH Y COL.,1994). Para ello, es necesaria una correcta y amplia información sobre las enfermedades de los cultivos. Hay cultivos que muy raramente causan problemas a los productores, mientras que en otros *Pythium* produce serias pérdidas repetidamente. Y, en lugar de abandonar el cultivo, es en estos casos donde conviene actuar mediante un estudio pormenorizado que permita adquirir el conocimiento necesario para estar en disposición de controlar la enfermedad con un coste aceptable y económicamente rentable.

El uso de fungicidas sintéticos se hace cada vez menos aceptable en horticultura, especialmente aquellas aplicaciones que se hacen "por si acaso", de forma rutinaria, sin que la enfermedad se haya presentado o cuando aparecen síntomas que pudieran atribuirse a otras causas y no se diagnostica cual de ellas es la productora del daño. Además, las crecientes restricciones impuestas por los reglamentos nacionales e internacionales a los productos fitoterapeúticos, con riesgo de toxicidad para el medio y para el hombre, reducen progresivamente las opciones de los productores y los cultivadores (HARTZ,1994).

Por su parte, el uso de fumigantes para la desinfección del suelo tiene efectos perjudiciales sobre la micoflora del suelo y sobre la micorrización de las plantas, al menos durante los dos primeros años del cultivo en vivero, lo que puede comprometer la salud y el vigor de los cultivos (JOHNSON Y ZAK,1977). Además, los costes asociados a estos tratamiento limitan su uso a cultivos de muy alto valor. En general, la decisión de fumigar un suelo se toma si existen otros problemas sanitarios (nemátodos, malas hierbas, etc.) que se adicionan al control de hongos de suelo (HARTZ,1994).

Para contribuir al control de las enfermedades en las primeras fases del cultivo en vivero de plantas ornamentales, cualquiera que sea su naturaleza, es recomendable seguir las normas básicas de conducta que se pueden resumir en cuatro puntos. En primer lugar. utilizar material de partida para la siembra o plantación con garantía de que esté libre de parásitos. Controlar el cultivo durante todo el proceso para apreciar cualquier alteración de su normal desarrollo desde el primer momento de su aparición. Además, cuidar escrupulosamente el correcto estado del suelo o sustrato, sus condiciones físicas, químicas y biológicas, especialmente aspectos tales como el drenaje, la fertilización, la compactación y la contaminación. Y, por último, la correcta aplicación de las técnicas culturales (manejo de riegos, aplicación de fitosanitarios, podas, transplantes, repicados, etc.) (COOLEY,1987; RATTINK,1996; HANSEN Y LEWIS,1997).

Rememorando palabras de KATAN (1981), no podemos aspirar a obtener un control total sobre el patógeno, es decir a erradicarlo, sino a reducir el nivel de enfermedad hasta el límite de lo económicamente rentable. Y la mejor forma de conseguirlo es optando por un control integrado que aúne las capacidades y las ventajas de todos los métodos conocidos, disminuyendo sus efectos negativos sobre el ambiente. Para conseguir este objetivo la investigación científica es imprescindible.

2. OBJETIVOS GENERALES

Sin apenas referentes en el ámbito regional y nacional, el primer objetivo de este trabajo consistió en identificar los agentes causantes de los daños que se producían en las plantas ornamentales sometidas a las condiciones de cultivo propias de la Comunidad de Madrid, con especial inclinación por las fases de producción en vivero.

Nuestro interés iba más allá del simple listado de agentes patógenos y huéspedes afectados. La intención era, en el caso de los patógenos de naturaleza fúngica, aislarlos en cultivo puro, identificarlos, determinar su patogenicidad y estudiar los más importantes.

A medida que avanzábamos en la investigación aparecían fenómenos sobre los que indagar. Centramos entonces nuestro trabajo en el estudio más profundo de diversos aspectos de la relación huésped-patógeno, y para ello, utilizamos como patógenos las especies de *Pythium* que habíamos aislado con mayor frecuencia y que se mostraron como las más virulentas. Como planta huésped escogimos la especie *Cupressus arizonica* Greene por ser mayoritariamente cultivada por los productores de la zona.

Nos dedicamos a evaluar la patogenicidad de algunos aislados, estimar la influencia de la edad del huésped y la especie fúngica en el desarrollo de la enfermedad, la expresión de síntomas y unos primeros estudios de eficacia de tratamientos con fungicida para el control de la enfermedad en semillero. Los ensayos se llevaron a cabo con plantas en las fases de semillero, trasplante y primer año de cultivo en maceta, en condiciones controladas y al aire libre, tratando de aproximarnos lo más posible a las condiciones reales de cultivo normal en vivero en la Comunidad de Madrid.

El objetivo final de este trabajo ha sido contrastar los conocimientos teóricos que hasta ahora existían sobre las enfermedades de plantas ornamentales en las etapas de nascencia y enraizamiento con su comportamiento real en las peculiares condiciones de cultivo de los viveros de la Comunidad de Madrid; acumular experiencia directa y, con ello, ser capaces de dar algunas recomendaciones a los productores de planta ornamental.

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1 MATERIALES

3.1.1 SUSTRATO

3.1.1.1 Ensayos en condiciones controladas

El sustrato utilizado era una mezcla de turba Brill sustrato nº1 (Agroselecta, S.L.), tamizada a través de una criba de 2 mm de diámetro, y vermiculita en proporción 1:1 (v/v), autoclavados ambos componentes durante 1 hora a 120 ºC.

La composición del sustrato Brill nº 1 según se cita en el "*Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*" (DE LIÑÁN, 1996) es la siguiente: materia orgánica 41,5% (mezcla de un 40% de turba rubia y un 60% de negra, enriquecido con 7,5 Kg de dolomita y 1,5 kg de complejo PG-MIX por m^3 de sustrato y complementado con 80 l de arena); pH 5,5-6; conductividad 900 - 1.200 µmh/cm. Recomendado para flor cortada y repicado.

A su vez, la composición del fertilizante PG-MIX 12.14.24 o 14.16.18 (Hydro Agri) según la misma fuente es: Complejo NPK con microelementos, desarrollado para su empleo en la preparación de sustratos. Equilibrio 1-1,17-2 o 1-1,14-1,29. Lleva nitrógeno amoniacal y nítrico, fósforo soluble en agua, potasio, boro, cobre, hierro (EDTA), manganeso, molibdeno y zinc. Todos los microelementos se encuentran en forma soluble en agua.

Las características de los sustratos utilizados en estos trabajos se describen en el ANEJO 13.1. La muestra presenta un pH ligeramente ácido (6,0) y una densidad real de 1,7 g/ml.

3.1.1.2 Ensayos de campo en umbráculo

Escogimos los sustratos procurando imitar las condiciones reales del vivero comercial de Madrid que nos sirvió de referencia. Las características de ambas mezclas se encuentran en el ANEJO 13.1.

Para los semilleros se utilizó un sustrato mezcla de la misma turba comercial Brill nº.1 (Agroselecta S.L.) autoclavada 1 hora a 130ºC y cribada por tamiz de 2 mm. de diámetro, y tierra procedente del vivero Puerta de Hierro (Madrid), autoclavada y tamizada igualmente[1]. La proporción de la mezcla es 1:4 (v/v). El pH es de 7,8 y la densidad real de la mezcla es 2,58 g/ml.

Para el transplante empleamos una mezcla de la misma turba Brill nº1 autoclavada y arena de río lavada en proporción 8:1 (v/v) con un pH de 7,1 y una densidad real de la mezcla de 1,183 g/ml.

[1] Es, a su vez, mezcla de tierra, mantillo y arena en proporción desconocida.

3.1.2 MATERIAL VEGETAL

Utilizamos semilla de *Cupressus arizonica* Greene suministrada por el Instituto para la Conservación de la Naturaleza (ICONA) de dos procedencias: Guadalajara (vivero "El Serranillo") y Valladolid 1991 [2]. Las semillas fueron esterilizadas previamente mediante inmersión en una solución acuosa de hipoclorito sódico al 2% durante 60 segundos y dos lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 15 minutos. Posteriormente se secaron sobre papel de filtro estéril y se estratificaron en arena autoclavada a 3°C hasta su utilización.

Para los ensayos de especificidad de huésped empleamos semilla comercial de *Petunia × hybrida* 'nana compacta' (Royalfleur, Francia) que conservamos en su envase hermético a 3-5°C hasta su utilización.

3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo se esterilizan en autoclave a 120°C durante 20 min. Los antibióticos y fungicidas se añaden posteriormente, cuando el medio se enfría hasta los 50°C, disueltos en una pequeña cantidad de agua destilada estéril.

3.1.3.1 Detección

Los tejidos de las plantas afectadas se disponen en cámara húmeda o lámina de agua. La cámara húmeda consistió en una placa Petri de vidrio esterilizada, de 14 cm. de diámetro, en la que se disponen varias láminas de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. La lámina de agua se prepara añadiendo una película de unos 2 mm. de agua no destilada, preferiblemente si procede de una laguna o una charca natural libre de sustancias tóxicas o inhibidoras del desarrollo de los hongos, en el fondo de una placa Petri de las mismas características. En ambos casos los tejidos del vegetal afectados se depositan dentro y el conjunto se incuba a 20-25°C. Se realizan observaciones periódicas y frecuentes al microscopio estereoscópico con el fin de detectar la presencia de hongos patógenos.

En los casos en que se sospechó la posible presencia de pitiáceos o de *Fusarium* también se sembraron partes de los tejidos del huésped en los medios semi-selectivos que veremos en el punto siguiente al tratar los medios de aislamiento (epígrafe 3.1.3.2).

3.1.3.2 Aislamiento

El aislamiento de los hongos de la familia *Pythiaceae* a partir de raíz de planta enferma se llevó a cabo con el medio sintético selectivo P_5ARP (JEFFERS Y MARTIN, 1986) con modificaciones (GÓMEZ-LIMÓN, 1996). En la composición de dicho medio P_5ARP se sustituyeron los 17 g/l de Difco agar harina de maíz (CMA) por 7 g/l de CMA (Difco) más 14

[2] Es la misma procedencia que la utilizada en vivero comercial.

g/l de agar bacteriológico (Difco) y se añadieron 12 mg/l de benomilo (24 mg/l de Benlate ®, 50% m.a., Du Pont). Para el aislamiento selectivo de la mayoría de las especies de *Phytophthora* se añadió a este medio 50 mg/l de hymexazol (139 mg/l de Tachigaren ®, 36% m.a., C.Q.Massó).

Para el aislamiento de hongos del género *Fusarium* se preparó el medio agar-patata-dextrosa (PDA) a partir de 39 g/l de un preparado comercial de PDA (Sigma) y 5 g/l de agar bacteriológico (Difco) en agua, y a dicho medio base se le añadió 0,5 g/l de sulfato de estreptomicina.

3.1.3.3 Identificación

Una vez aislados los hongos pitiáceos en medio base CMA, y siguiendo las recomendaciones del Dr. G. HALL (com.personal), el medio más apropiado para las identificaciones de los pitiáceos es agar-judía de Lima (LBA) porque es un medio transparente, que permite la fácil observación de las estructuras del hongo y cuya consistencia blanda facilita mucho las preparaciones microscópicas. El medio se compone de 23 g/l de LBA comercial (Difco) en agua.

En ciertos casos, para favorecer la producción de esporas en los aislados, las identificaciones también se realizaron a partir de muestras de raíces dispuestas en lámina de agua con cebo de hojas de gramínea, por ser este un medio propicio para el desarrollo tanto de esporangios (en el agua) como de oosporas (en el tejido vegetal). Se trata de colocar, en una placa Petri de vidrio de 9 cm de diámetro, unas hojas jóvenes de gramínea (nosotros utilizamos hojas de maíz), partidas en trocitos de 4 cm. de largo y 0,5 cm. de ancho y previamente autoclavadas a 120°C durante 20 min., en una lámina de agua esterilizada (mejor si es de charca, para evitar el exceso de cloro y metales que son tóxicos para *Pythium*) a la que se añaden unos círculos de 1 cm. de diámetro tomados de un cultivo del aislado en medio sintético, generalmente medio CMA base (sin antibióticos ni fungicidas).

3.1.3.4 Conservación

Los hongos de la familia *Pythiaceae* se conservaron *in vitro* en tubos de ensayo, de 18 mm de diámetro, con medio de harina de maíz (CMA) o de harina de avena (OMA).

El medio base CMA se prepara de la forma indicada en 3.1.3.2 al referirnos al medio de aislamiento P_5ARP.

El medio OMA se prepara en agua destilada a partir de 30 g/l de harina de avena y 20 g/l de agar Oxoid nº.3 (HALL, 1993). Se calienta la avena en 500 ml de agua durante 30 min, luego se deja hervir durante otros 30 min. Por su parte, el agar se disuelve en el resto de agua. Entonces la avena se cuela a través de una muselina fina, se añade al agar y se esteriliza en autoclave.

Los aislados de *Fusarium* se conservaron en tubos de ensayo del mismo tamaño con arena esterilizada a la que se añadió una suspensión de esporas del hongo.

Los aislados utilizados en los ensayos posteriores se mantuvieron activos en planta viva de semillero.

3.1.3.5 Preparación de inóculos

En el caso de los pitiáceos, tras una primera fase de reaislamiento en el medio P_5ARP modificado descrito en el apartado 3.1.3.2, para la preparación de los inóculos se utilizó el medio sintético Agar V-8. Dicho medio se compone de: 200 ml de jugo V-8 (preparado a partir de Sopa V-8 Campbell diluida en agua destilada (1:2 v/v), hervida y filtrada a través de muselina), 3 g. de CO_3Ca, 20 g. de agar Oxoid nº3 y 800 ml de agua destilada.

Para los inóculos de *Fusarium* los aislados se cultivaron en medio base agar-patata-dextrosa (PDA) citado en el epígrafe 3.1.3.2.

3.1.3.6 Recuperación de patógeno

Se realiza a partir de raíz de planta enferma, cultivándola sobre el mismo medio P_5ARP modificado citado en 3.1.3.2 para el aislamiento, y medio LBA (ver 3.1.3.3) para la identificación.

3.1.4 INÓCULOS

Los ensayos de patogenicidad previos se realizaron sobre trece aislamientos obtenidos por nosotros durante el proceso de diagnóstico de las muestras de plantas enfermas recogidas en los viveros de producción de planta ornamental o en jardines y parques públicos y privados de la Comunidad de Madrid. De ellos, ocho correspondían a las tres especies más numerosas de *Pythium* (tres de *P.irregulare* Buisman, tres de *P.paroecandrum* Drechsler y dos de *P.intermedium* de Bary), cuatro de *Fusarium* spp. y una de *Phytophthora cactorum* (Lebert&Conh)Schroter (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.-Procedencia de los aislados utilizados en las pruebas de patogenicidad y fechas de aislamiento.

Aislado	Especie	Huésped	Procedencia	Fecha
CA013	*P.irregulare*	*Cupressus arizonica*	Viv. Puerta de Hierro	02/1992
CA040	*P.irregulare*	*Cupressus arizonica*	Viv. Puerta de Hierro	12/1991
CA0131	*P.irregulare*	*Cupressus arizonica*	Viv. Puerta de Hierro	11/1992
CL039	*P.paroecandrum*	*Cupresocyparis leylandii*	Viv. El Encín	10/1992
CA031	*P.paroecandrum*	*Cupressus arizonica*	Viv. San Martín	02/1993
TX036	*P.paroecandrum*	*Taxus sp.*	Madrid (P° Prado)	09/1992
CM018	*P.intermedium*	*Cupressus macrocarpa*	Viv. Puerta de Hierro	10/1992
PN004	*P.intermedium*	*Pyracantha coccinea*	Viv. Puerta de Hierro	10/1992
CR002	*P. cactorum*	*Crataegus sp.*	Viv. Puerta de Hierro	11/1991
F004	*Fusarium sp.*	*Cupressus macrocarpa*	Viv. San Martín	02/1993
F006	*Fusarium sp.*	*Cupressus arizonica*	Viv. San Martín	02/1993
F007	*Fusarium sp.*	*Cupresocyparis leylandii*	Viv. San Martín	02/1993
F008	*Fusarium sp.*	*Pyracantha coccinea*	Viv. Puerta de Hierro	03/1993

Para los ensayos en condiciones controladas se utilizaron los aislados CA013 de *Pythium irregulare* Buisman, CM018 de *Pythium intermedium* de Bary y CL039 de *Pythium paroecandrum* Drechsler, que fueron obtenidos por nosotros a partir de raíces de plantas enfermas de *Cupressus arizónica* Greene (plantas de un año procedentes de semilla, trasplantadas en maceta a los 6-7 meses de la siembra y mantenidas al aire libre con riego por aspersión), de *Cupressus macrocarpa* Hartw (plantitas de 6-7 meses de edad desde la siembra, transplantadas a maceta aproximadamente 10 días antes de aparecer los síntomas de enfermedad y cultivadas en túnel de plástico con riego por microaspersión) y de *Cupresocyparis leylandii* (estaquillas enraizadas cultivadas en maceta, en umbráculo y riego por goteo en condiciones de exceso de agua) respectivamente, y reaislados de plántulas de semillero de *C. arizonica* inoculadas en laboratorio y que mostraron síntomas de "damping-off". Los aislados se escogieron atendiendo a su mayor producción de esporas en cultivo en medio sintético y mayor virulencia en pruebas de patogenicidad previas.

Los ensayos de campo se realizaron inoculando las plantas con los dos aislados patógenos de las especies *Pythium irregulare* Buisman (CA013) y *Pythium intermedium* de Bary (CM018) descritos en el párrafo anterior.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y AISLAMIENTO

De las plantas afectadas se tomaron muestras con tres grados de enfermedad: plantas asintomáticas, plantas con ataque medio y plantas con ataque severo. De cada tipo se recogieron de tres a cinco plantas para las cultivadas en contenedor y una zona de aproximadamente 20 cm^2 para los semilleros o estaquillados.

Las raíces de las plantas se limpiaron cuidadosamente con agua corriente hasta eliminar los restos de sustrato adherido a ellas. En las plantas adultas, con un desarrollo radicular grande, se seleccionó, según una distribución homogénea en el espacio, un tercio del mismo para su estudio en laboratorio, con preferencia por las raíces finas. Una vez limpias, las raíces finas se esterilizan superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% durante 60 segundos y en hipoclorito sódico al 2% durante 30 s, mientras que las raíces más gruesas se mantuvieron de 3 a 5 min. en etanol y 2 min. en hipoclorito sódico. Se aclararon con dos lavados en agua destilada estéril durante 15 min. y se secaron sobre papel de filtro estéril. Finalmente, segmentos de aproximadamente 1 cm. de longitud se dispusieron en placas Petri de 9 cm. de diámetro con los medios agarizados semi-selectivos que se especifican en 3.1.3.2; o bien se colocaron en cámara húmeda y lámina de agua (ver 3.1.3.1). Cuando las plantas mostraron daños en parte aérea (tallos, hojas o flores) los órganos afectados se colocaron en cámara húmeda.

Tanto los cultivos en medio sintético como las muestras en cámara húmeda y lámina de agua se incubaron a 22-24°C en oscuridad y se observaron regularmente al microscopio estereoscópico (50x aumentos) para detectar el crecimiento de hongos potencialmente patógenos. Cuando dichos hongos fueron detectados se procedió a su aislamiento mediante siembras, en los medios selectivos antes indicados (en 3.1.3.2), de pequeños trozos de tejido o de agar, en su caso, que portaban alguna estructura fúngica. Se continuó con el cultivo sucesivo en dichos medios selectivos de extremos de hifas en crecimiento activo tomadas del frente de crecimiento a los dos o tres días de la siembra hasta completar el aislamiento en cultivo puro.

Una vez aislados, los hongos de la familia *Pythiaceae* se cultivaron en medio base CMA (ver 3.1.3.2) para su posterior identificación y conservación. Para las identificaciones los hongos se cultivaron en el medio LBA (ver 3.1.3.3). Los hongos del género *Fusarium* se cultivaron en medio PDA (consultar 3.1.3.2) para su identificación y conservación.

Además, para favorecer la formación de las estructuras sexuales y asexuales de algunos aislados de *Pythium*, se incubaron entre 20 y 22°C en lámina de agua con hoja de gramínea como se explica en 3.1.3.3. De este modo, en un tiempo variable según especies, los *Pythium* desarrollan primero los esporangios en el agua y, posteriormente, oogonios y anteridios colonizan las hojas de gramínea.

Los géneros se identificaron por sus características morfológicas principalmente. Para la clasificación de *Pythium* se empleó la clave de VAN DER PLAATS-NITERINK (1981). Para *Phytophthora* se usaron las de WATERHOUSE (1970) y STAMPS Y COL. (1990).

Veintiún aislados se enviaron al International Mycological Institute (IMI), en el Reino Unido, para verificar su clasificación completa.

3.2.2 TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS

Los hongos de la familia *Pythiaceae* se conservaron *in vitro* en tubos de ensayo con medio de harina de maíz (CMA) o de harina de avena (OMA) (ver 3.1.3.4) y cubiertos con una lámina de aceite de vaselina líquida esterilizada de 1 cm. de espesor (SMITH, 1993). Los tubos se guardaron en cámara frigorífica a 3-4°C y se transfirieron a medio fresco una vez al año.

Además, los aislados utilizados en trabajos posteriores se mantuvieron activos en planta viva de semillero inoculada artificialmente en las primeras semanas después de la emergencia. Las plantas que se utilizaron fueron de la especie *Cupressus arizonica* Greene. Las plántulas que mostraron síntomas de enfermedad se limpiaron, se secaron parcialmente y se guardaron envueltas en sobres de papel en cámara frigorífica a 3-4°C hasta el momento del reaislamiento.

Los *Fusaria* se conservaron en tubos de ensayo con arena de río lavada y tamizada por una criba de 2 mm de diámetro. La arena se añadió a cada tubo hasta rellenar ¼ de su volumen total y, acto seguido, los tubos se cerraron con tapón de plástico y se esterilizaron tres veces sucesivas en autoclave a 1 atm. y 120°C durante 20 min. Posteriormente se prepara una solución de esporas del hongo de forma similar a como se explicará más adelante en el punto 3.2.4.2, que se añadió con pipeta estéril a la arena a razón de 2 ml por tubo. Los tubos se conservaron en cámara frigorífica a 3-4°Celsius y se repicaron periódicamente cada 6 meses.

3.2.3 TÉCNICA DE RECUPERACIÓN DE PATÓGENO

De los contenedores se extraen a mano las plantas, con sus raíces, cuidadosamente, y se lavan en agua corriente para eliminar restos del sustrato adheridos. Se esterilizan superficialmente siguiendo el mismo procedimiento descrito para el tratamiento de las muestras para diagnóstico en 3.2.1. Se secan sobre papel de filtro estéril en la cámara de flujo laminar y se dividen también en segmentos de 1 cm. de longitud antes de sembrarlos en placas de Petri de plástico, estériles, de 9 cm. de diámetro con el medio selectivo P_5ARP modificado según se relata en 3.1.3.6. Se incuban a 22 °C en estufa, en oscuridad, durante 48 horas. Pasado ese tiempo, se anota el número de raíces de las que se reaisla el patógeno inoculado con lo que se calcula el porcentaje de recuperación de patógeno.

Acto seguido, los cultivos se transfieren a medio agar judía de Lima (LBA) (ver 3.1.3.3) y se cultivan en las mismas condiciones durante 48-72 horas para su identificación al microscopio óptico.

Con las raíces de mayor desarrollo, como las que presentan las plantas en el segundo año de cultivo, se opera de la forma descrita en 3.2.1.

3.2.4 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

3.2.4.1 Siembra

Se sembraron 3 gramos de semilla en alvéolos de plástico de 6,5×6,5×6 cm^3. La semilla se reparte entre la superficie del sustrato a voleo y se cubre ligeramente con una capa de sustrato de aproximadamente 0,5 cm. de espesor. Se riega cuidadosamente el sustrato evitando que la semilla quede expuesta.

3.2.4.2 Preparación de los inóculos

Los pitiáceos conservados en las raíces de plantas de *C.arizonica* en cámara frigorífica a 3ºC se reaislan con el medio sintético selectivo P_5ARP con modificaciones explicado en el apartado 3.1.3.2 mediante repicados sucesivos. Trabajando en condiciones asépticas, las raíces se rehidratan en agua destilada estéril durante 5-10 min, se elimina el exceso de agua depositándolas sobre un papel de filtro esterilizado y se siembran en placas Petri, estériles, de 9 cm. de diámetro con dicho medio P_5ARP modificado. Se cultivan a 22 ºC en oscuridad durante 48 horas. En ocasiones se necesita más tiempo hasta que las estructuras del hongo reproducen el micelio que crece dentro del medio, pero, en general, es suficiente con una incubación de 4-5 días. Antes de que el crecimiento del micelio invada todo el diámetro de la placa, se transfiere a medio fresco una pequeña parte de agar que contenga el micelio del hongo, tomado del frente activo de crecimiento y se procede a su incubación en las mismas condiciones. El proceso se repite, si es necesario, hasta que se compruebe que el cultivo contiene solamente las estructuras del hongo que se desea para la inoculación.

Para la preparación del inóculo, los hongos así aislados se crecieron en placas Petri de 9 cm. de diámetro con medio Agar V-8 (ver 3.1.3.5) y se incubaron de 7 a 14 días a 22-25 ºC en oscuridad. El inóculo se consiguió preparando una suspensión de dicho cultivo en agua destilada estéril, a razón de 1 placa por cada 40 ml. de agua. La mezcla se bate mecánicamente en batidora (omnimixer ®) durante 5 min. a velocidad media ó bien en homogeneizador (Schott) durante 2 min. a 20.500 rpm. La suspensión contiene una mayoría de esporas junto con algunos restos de micelio. Para los testigos se preparó un caldo a base de medio agar V-8 y agua destilada estéril en las mismas proporciones.

El inóculo de *Fusarium* se prepara como una suspensión de conidias en agua destilada estéril. El hongo se extrae de los tubos de conservación y se siembra en estría con un asa de siembra sobre medio base PDA en placas Petri de 9 cm de diámetro y se incuba a 22-25ºC durante 7 días. Pasado ese tiempo se prepara una suspensión de conidias en agua destilada estéril añadiendo 20 ml de agua destilada estéril a cada placa y raspando la superficie del medio con una aguja de siembra esterilizada de modo que se desprendan las esporas y parte del micelio crecido sobre el medio de cultivo. Con objeto de eliminar los restos de micelio la suspensión se filtra a través de lana de vidrio estéril.

En todos los casos los cálculos de concentración de esporas en el inóculo se realizaron a partir del recuento realizado varias veces en un hematocitómetro tipo Bürker.

3.2.4.3 Inoculación

Por regla general, se regó el sustrato con la suspensión de esporas a razón de 5 ml. por alvéolo, cuidando de incorporarlo bien dentro de la capa superior del sustrato (3-4 cm. en los alvéolos, bandejas de semillero o macetas).

3.2.4.4 Incubación

Durante los ensayos las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo sometidas a un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, con una iluminación de 136 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, con oscilación de temperaturas noche/día, y cierto control de la humedad relativa que se mantuvo en torno al 80-85%. Los detalles se expondrán en el epígrafe correspondiente a cada ensayo.

3.2.4.5 Parámetros evaluados

Se tomaron datos semanalmente. Por un lado, se anotó el número de plantas muertas en relación al total de plantas nacidas en cada repetición, con lo que se calculó el porcentaje de plantas afectadas por la enfermedad (porcentaje de mortalidad) parámetro que estima la incidencia de la enfermedad; y por otro, se midieron las longitudes de tallo y raíz principal y se registraron los pesos frescos y secos de parte aérea y sistema radicular de las plántulas supervivientes al finalizar el ensayo, con objeto de cuantificar el posible efecto del patógeno sobre el crecimiento de las plantas en contacto con él.

Para la medida del sistema radicular se consideró suficientemente representativa la longitud de la raíz principal dado que, en el caso de las plantas del género *Cupressus,* se trata de una raíz pivotante claramente predominante durante el período juvenil (TUSSET E HINAREJOS, 1995). La medida de las longitudes se realiza según método de recuento manual, por observación visual del número de intersecciones entre las raíces o tallos y una regla graduada en milímetros. Es un método sencillo, de precisión aceptable cuyo nivel de imprecisión se cifra en un máximo de un 12% para la estimación de la longitud de raíz (BLAND, 1992). La medida de los pesos frescos y secos se obtiene mediante pesada en balanza de precisión, una vez limpias las plantas de restos de tierra y otros residuos y, para el peso seco, previa deshidratación en estufa a 30ºC durante 7 días. Con estas últimas medidas se pretendía detectar si el patógeno produce algún efecto en el crecimiento de las plantas que conviven con él aunque no lleguen a manifestar síntomas de la enfermedad.

Para la recuperación del patógeno inoculado se consideró el porcentaje de plantas de las cuales se pudo reaislar el mismo hongo que había sido inoculado, y se denominó "porcentaje de recuperación de patógeno".

3.2.5 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO

3.2.5.1 Siembra

La siembra se realizó en primavera (de finales de marzo a mayo) siguiendo uno de los dos procedimientos siguientes:

A) a voleo, en bandejas de plástico de 31×20×6,5 cm^3 (volúmen=4.030 cm^3) con orificios para drenaje en la base, una cantidad de 10 gramos de semilla por bandeja, mezcla de las dos procedencias: 5 gr. de Guadalajara 1991 y otros 5 gr. de Valladolid 1991. La semilla se recubre por una fina capa (0,5 cm. aproximadamente) de tierra del vivero tamizada. Inmediatamente después de la siembra se aplica un riego con microaspersores que proporcionan una lluvia fina. Las semillas se dejaron en remojo en agua durante la hora anterior a la siembra (Fig.3.1.A).

B) la misma mezcla de semillas se sembró también a voleo, pero no en bandejas sino en una era de 2×1,75 m^2. Las plantas se mantendrán en la era hasta el transplante en las mismas condiciones de sustrato y ambiente dichas en el párrafo anterior.

3.2.5.2 Transplante

Llegado el otoño (meses de octubre y noviembre) las plantas del semillero se transplantan a maceta de plástico, de 14 cm de diámetro (volúmen=1.500 cm^3), a razón de una planta por maceta (Fig.3.1.B). Se agrupan por bloques en el umbráculo con riego por microaspersión, depositados sobre una capa de arena de 1 cm. de espesor que recubre una lámina de plástico negro, con objeto de aislar las macetas del contacto con el suelo, siguiendo el mismo procedimiento que utilizan en el vivero. Los bloques se distribuyen al azar dentro del umbráculo, con un total de tres bloques por tratamiento (Fig.3.1.C, 3.1.D, 3.1.E y 3.1.F).

3.2.5.3 Preparación de inóculo

El inóculo se preparó siguiendo exactamente las indicaciones expuestas en el apartado 3.2.4.2 con los medios descritos en 3.1.3.5. A los controles se les aplica la misma cantidad de una suspensión de Agar V-8 en agua realizada en idéntica forma.

3.2.5.4 Inoculación

El método de inoculación en las bandejas es similar al descrito en 3.2.4.3. Las inoculaciones se realizaron aplicando una dosis de inóculo de 20 ml de la suspensión de esporas por bandeja (que supone 5 ml por cada 20-30 plantas en el semillero).

Para las inoculaciones en maceta se perforan tres agujeros en el sustrato de cada maceta cerca del cuello de la planta, descubriendo algunas raicillas, formando entre sí ángulos de 120° aproximadamente y unos 5 cm. de profundidad. Se reparten 5 ml. de la suspensión de inóculo entre los tres huecos y se tapan de nuevo con el sustrato.

3.2.5.5 Condiciones ambientales

Los ensayos se llevaron a cabo en los Campos de Prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Tanto las bandejas y la era del semillero como las macetas del transplante se disponen en un umbráculo al aire libre (sombreo de la malla del 30%), apoyadas sobre una capa de arena dispuesta sobre una lámina de plástico negro (Fig.3.1.E).

Se dispone de riego automatizado por microaspersión con difusores Maxi-jet N-4134 (Nelson) cuyas características son: presión de trabajo=1,5 bar, caudal=42 l/h y diámetro de alcance=5,8 m. La frecuencia y dosis de riego varía con las condiciones ambientales naturales y alcanza un máximo de 3 riegos diarios de 30 min. en verano.

3.2.5.6 Parámetros evaluados

Después de la inoculación, semanalmente, se registran los datos de número de plantas nacidas, muertas y dañadas (con síntomas de enfermedad) para cada tratamiento. Las plantas muertas se extraen y se procesan en laboratorio para evaluar los porcentajes de recuperación de patógeno en cumplimiento del último postulado de Koch de la forma antes explicada en 3.2.4.5.

En el momento del transplante, se toman las plantitas que han sobrevivido a las inoculaciones anteriores para medir las longitudes de tallo y raíz principal y los pesos frescos y secos de parte aérea y sistema radicular. En dichas medidas se respeta el método señalado en 3.2.4.5.

En las plantas transplantadas se controla semanalmente la mortalidad (porcentaje de plantas muertas), el crecimiento (altura de las plantas), y los síntomas aparentes de enfermedad. Al final del ensayo se miden las longitudes de tallo y raíz principal, y sus respectivos pesos frescos y secos, por los procedimientos antes explicados en 3.2.4.5. y también se examina la recuperación de patógeno según lo indicado en 3.2.3.

Al final del ensayo con plantas de dos años el desarrollo de las raíces es tal que ocupan la totalidad de la maceta, incluso algunas plantas emiten raíces fuera del contenedor a través de los orificios de drenaje, por lo que se desestima la conveniencia de tomar datos de desarrollo del sistema radicular.

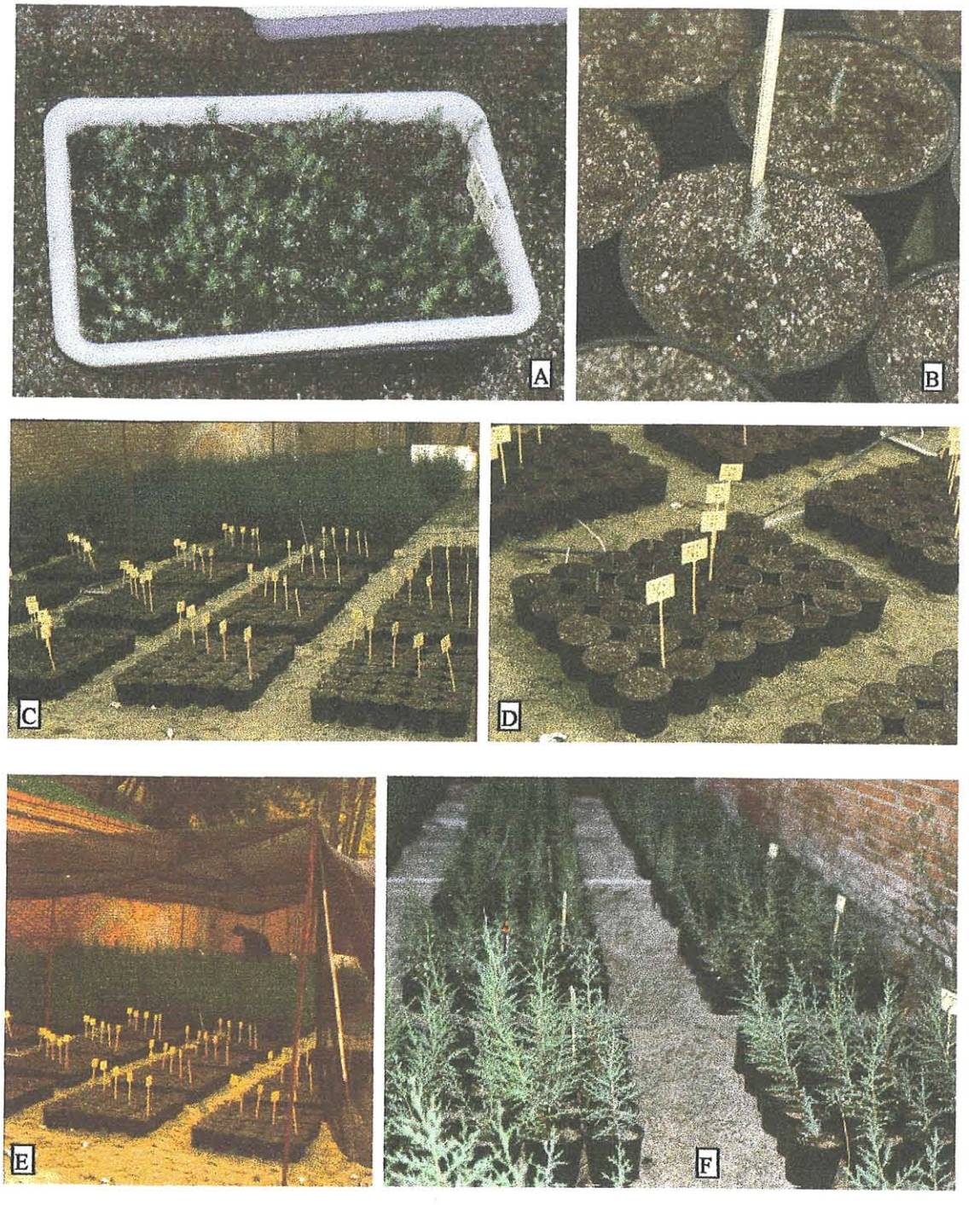


Figura 3.1. A) Siembra en bandejas para los ensayos de campo en umbráculo; B) Detalle de la plantita de *Cupressus arizonica* recién transplantada en maceta; C) Las macetas con las plantas transplantadas se dispusieron sobre un lecho de arena y se distribuyeron en bloques por tratamientos; D) Detalle de la disposición de las macetas en bloques separados por calles; E) Vista general del umbráculo con la disposición de los bloques. Delante, las plantas de primer año, al fondo las de segundo año. F) Vista parcial de la disposición de las plantas de *Cupressus arizonica* durante la primavera del segundo año de cultivo.

3.2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron analizados con los programas estadísticos STATGRAPHICS 6.0 (Statistical Graphics Corp., USA, 1992), EXCEL 7.0a (Microsoft Corp., USA, 1996) y STATISTICA 4.0 (StatSoft Inc., USA,1993).

3.2.6.1 Diseño estadístico de los ensayos

Por lo general los ensayos se plantean siguiendo un diseño en bloques al azar, con tres repeticiones. Cada repetición incluye un número variable de individuos que se detallará en cada ensayo.

3.2.6.2 Tests paramétricos

Los análisis estadísticos se comenzaron con la comprobación de las hipótesis a priori de normalidad y homoscedasticidad mediante los tests de Kolmogorv-Smirnov y de Barlett, respectivamente, al nivel de confianza del 95%. Para los casos en que se cumplían las hipótesis nulas, se continuó con el análisis de la varianza ANOVA mediante la prueba F de Snedecor, por ser la más potente para este tipo de supuestos. Si del ANOVA resulta que existen diferencias significativas entre las poblaciones para un nivel de significación del 5% se procede a la comparación múltiple de las medias muestrales mediante los test LSD , Duncan y/o Scheffé.

Los datos de porcentaje se sometieron a una transformación del tipo arcoseno de la raíz cuadrada de los valores medidos en tanto por uno ($\text{arcsen}\sqrt{y/100}$), con objeto de cumplir con la hipótesis de homogeneidad de varianzas.

En ciertos casos los datos de longitudes y pesos hubieron de modificarse según una transformación de tipo logarítmico ($y = Ln(x)$) o mediante la raíz cuadrada ($y = \sqrt{x}$).

Cuando los valores de la variable eran menores que la unidad, antes de proceder a la transformación se corrigió este hecho, ya fuera sumando la unidad o multiplicando por 10 hasta conseguir que los valores superaran dicho valor y evitar los resultados negativos.

3.2.6.3 Tests no paramétricos

Cuando no se cumplió la condición de normalidad se recurrió a la estadística no paramétrica procediéndose al análisis de la varianza mediante el test de Kruskal-Wallis, por ser el más robusto dentro de la estadística no paramétrica. Cuando el resultado es de rechazo de la hipótesis nula la comparación de medias se realizó aplicando el test U de Mann-Whitney, que es el equivalente al test "t" para muestras independientes, aunque basándose en rangos y no en medias. Este test es el más robusto de los no paramétricos; de hecho, en ciertos

casos puede ser más potente a la hora de rechazar la hipótesis nula (MANUAL DE STATISTICA 4.0, 1993).

3.2.6.4 Cálculo de AUDPC

Las curvas de progreso de enfermedad se analizan mediante el cálculo del área bajo la curva (AUDPC) y su comparación estadística a través de ANOVA F de Snedecor.

El cálculo del área se realiza aplicando el método de integración trapezoidal según lo indicado por CAMPBELL Y MADDEN (1990).

Las curvas de crecimiento del huésped (evolución de la altura de plantas en el tiempo) se estudian de la misma forma.

3.2.6.5 Regresiones

3.2.6.5.1 Lineales

En los casos en que gráficamente se aprecia con claridad que las curvas de crecimiento del huésped pueden ajustarse al modelo lineal se estudian aplicando regresiones lineales. Se comprueba el ajuste, se calculan los parámetros de la regresión y se comparan mediante el cálculo de los intervalos de confianza (CAMPBELL Y MADDEN, 1990), mediante la fórmula:

$$(r_1 - r_2) \pm t[P/2; n_1 + n_2 - 2p].s(d)$$

donde:
r_i = parámetro a evaluar
P = nivel de significación
n_i = número de observaciones
p = número de parámetros del modelo
$s(d)$ = error típico calculado como: $s(d) = \sqrt{s^2(r_1) + s^2(r_2)}$
t = valor tabulado del cuantil en la distribución t de Student.

Si el intervalo así calculado incluye el valor cero "0" se rechaza la hipótesis nula, es decir se rechaza la igualdad entre los parámetros comparados.

3.2.6.5.2 No lineales linealizables

Las curvas de progreso de enfermedad se evaluaron en su ajuste a cuatro modelos: Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz Estos modelos fueron descritos por CAMPBELL Y MADDEN (1990) en el capítulo 8 (pags. 167-176) de su libro "*Introduction to Plant*

Disease Epidemiology". Para decidir a qué modelo se ajustaban mejor los datos se compararon los coeficientes de determinación (R^2), el cuadrado medio del error de la regresión (MSE), los coeficientes de determinación calculados (R^2c) y los errores típicos para la regresión lineal de los valores predichos por cada modelo y los valores reales observados, con objeto de ser comparados entre sí, y, por último, la distribución de los residuos o su autocorrelación según el test de Durbin-Watson. En el estudio de los residuos se trata de comprobar si cumplen la hipótesis de independencia. Si existiera una correlación positiva entre ellos las desviaciones típicas estimadas serían menores que las reales, dando una falsa impresión de alta precisión (CAMPBELL Y MADDEN, 1990). Para que sea aceptable su valor debe situarse entre 1,5 y 2,5 (LYMAN, 1993).

Se completó el análisis con la comparación de los parámetros, según el método de los intervalos de confianza explicado en 3.2.6.5.1 para cada par de tratamientos.

4. ENFERMEDADES OBSERVADAS EN VIVEROS DE PLANTAS ORNAMENTALES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La idea de este trabajo nació de la existencia de un problema de carácter sanitario en los viveros de producción de planta ornamental, que obligaba a los productores a la aplicación de productos fitosanitarios de forma habitual y repetida sin que se hubiera identificado el agente causal. No se habían realizado estudios en la Comunidad de Madrid con anterioridad sobre las enfermedades que afectaban a las especies ornamentales y el interés del sector viverista y de la Comunidad de Madrid era grande. Como ya se indicó anteriormente, la única referencia que existía se encontraba en la Cátedra de Patología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid, y consistía en un conocimiento de los problemas sanitarios aparecidos a lo largo de muchos años, como fruto de las consultas efectuadas por organismos públicos, entidades privadas y particulares, pero este archivo necesitaba ser completado con estudios más profundos y sistemáticos.

El objetivo concreto de esta primera parte del trabajo, que llevamos a cabo desde finales del año 1991 hasta los primeros meses de 1995 en la Comunidad de Madrid fue el conocimiento de las enfermedades más relevantes, que afectaban principalmente en la fase de producción de planta ornamental en nuestra Comunidad.

En un primer momento, nos encontrábamos con un desconocimiento sobre cuáles eran las enfermedades más importantes o más peligrosas de entre todas las que afectaban a las plantas ornamentales en la Comunidad de Madrid. Así pues, comenzamos realizando una prospección de los viveros y continuamos recibiendo muestras de plantas ornamentales afectadas por enfermedades o alteraciones.

A través del estudio de las muestras que recibíamos en el laboratorio y de las recogidas personalmente por nosotros en las visitas que realizamos a los viveros de producción de planta ornamental, pretendíamos valorar la presencia y cuantificar la importancia de los agentes productores de enfermedad.

Los hongos potencialmente patógenos, detectados en las plantas enfermas, fueron aislados e identificados y, posteriormente se cuantificó su frecuencia de aislamiento. Con los más representativos se llevaron a cabo varios ensayos para la determinación de su patogenicidad, y así completar la comprobación de los postulados de Koch. Asimismo, se planearon y ejecutaron ensayos para identificar los aislados más virulentos y con mejores características para su cultivo en medio sintético y para determinar las concentraciones de inóculo para los ensayos posteriores.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO

El trabajo de investigación sobre las plantas ornamentales en la Comunidad de Madrid que comenzamos a finales de 1991, se centró principalmente en las primeras etapas del cultivo, es decir, su producción en vivero. Trabajamos con las muestras de plantas enfermas que personalmente recogíamos en los viveros, y ocasionalmente con las que nos eran enviadas al laboratorio (Tablas 13.3.2 y 13.3.3).

A partir de las plantas que presentaban síntomas de enfermedad se tomaron muestras que procesamos en el laboratorio de la forma descrita en el punto 3.2.1.TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO, CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA Y AISLAMIENTO. Cuando fue posible se controló visualmente la evolución de la enfermedad y se tomaron muestras periódicamente para su estudio en laboratorio.

4.2.2 AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

Al ser detectados los agentes patógenos posibles causantes de la alteración, y siempre que se trataba de hongos de la Familia *Pythiaceae* o del género *Fusarium*, se procedió a su aislamiento en cultivo puro, como se indicó en el epígrafe 3.2.1.

La identificación y caracterización taxonómica se realizaron atendiendo principalmente a su morfología empleando las claves de clasificación que se detallan en el epígrafe 3.2.1. Como ya se decía en ese mismo apartado, veintiún aislados, escogidos de entre todos los aislados de especies de hongos pitiáceos conseguidos, fueron enviados al International Mycological Institute (IMI), en el Reino Unido, para confirmar su clasificación completa.

Los hongos de la familia *Pythiaceae* se conservaron *in vitro* en tubos de ensayo de la forma vista en 3.2.2 y se guardaron en frío a 3-4°Celsius. Por otro lado, los aislados que más tarde empleamos en los ensayos posteriores se mantuvieron activos en plántulas de *Cupressus arizonica* Greene de la forma indicada en 3.2.2. Por su parte, *Fusarium* se conservó en tubos de ensayo con arena esterilizada a la que se añadió una suspensión de esporas del hongo (consultar 3.2.2).

4.2.3 BIOENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

4.2.3.1 Determinación de patogenicidad

Con varios aislados de las especies de *Pythium* más frecuentemente obtenidas y con otros aislados representativos de los géneros *Phytophthora* y *Fusarium*, se realizaron dos pruebas de patogenicidad en laboratorio, con el fin de comprobar el cumplimiento de los postulados de Koch.

Ocho aislamientos de *Pythium*, uno de *Phytophthora* y cuatro de *Fusarium* fueron evaluados en las pruebas de patogenicidad en laboratorio, como se expone en el epígrafe 3.1.4.INÓCULOS. Se escogieron los aislados que, habiendo sido caracterizados taxonómicamente, presentaban también un mejor comportamiento para su cultivo en medio sintético y su manejo en el laboratorio, a la hora de la preparación de las suspensiones de inóculo y de la inoculación en si misma; es decir, aquellos que producían mayor cantidad de esporas en menor tiempo en medio de cultivo y producían una suspensión de viscosidad más adecuada para la aplicación al sustrato.

La preparación de los inóculos y el método de inoculación se ajustaron a lo dispuesto en el epígrafe 3.2.4. Se inocularon plantas de *Cupressus arizonica* Greene, cuya procedencia y tratamiento previo a la siembra quedaron expuestos en 3.1.2.MATERIAL VEGETAL. El sustrato se componía de una mezcla de turba y vermiculita ya descrita en el apartado 3.1.1.1 para los ensayos en condiciones controladas.

En el primer ensayo de determinación de patogenicidad se inocularon 16 plantas por cada aislado, sin repeticiones, que se cultivaron en alvéolos individuales de 3×3×3,5 cm^3 de volumen. Las semillas se pusieron a germinar previamente en cámara húmeda a 22± 2 °Celsius y, una vez germinadas, se colocaron una a una en los alvéolos, con cuidado de no dañar la radícula, y continuaron su desarrollo hasta el momento de la inoculación, un mes más tarde. Se aplicó 1 ml de suspensión del inóculo por planta.

En el segundo ensayo se sembraron 3 g de semilla en macetas de plástico de 14 cm de diámetro y se regó el sustrato con 5 ml de las suspensiones de inóculo. Se dispusieron tres repeticiones por cada aislado.

Las suspensiones de inóculo que se prepararon en cada ensayo resultaron con las concentraciones que se indican en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Concentraciones de inóculo empleadas en los ensayos de patogenicidad.

Aislado	Especie	Concentración de inóculo ($\times 10^4$ esp/ml)	
		Primer ensayo	Segundo ensayo
CA040	*Pythium irregulare*	6,9	-----
CA013	*Pythium irregulare*	7,6	6,3
CA0131	*Pythium irregulare*	5,9	-----
CL039	*Pythium paroecandrum*	7,0	3,3
CA031	*Pythium paroecandrum*	7,0	-----
TX036	*Pythium paroecandrum*	7,0	-----
CM018	*Pythium intermedium*	3,7	3,1
PN004	*Pythium intermedium*	2,0	-----
CR002	*Phytophthora cactorum*	-----	5,0
F004	*Fusarium sp.*	-----	400,0
F006	*Fusarium sp.*	-----	350,0
F007	*Fusarium sp.*	-----	400,0
F008	*Fusarium sp.*	-----	380,0

Las infecciones se realizaron con una suspensión de micelio y oosporas (caso de *P. irregulare, P.paroecandrum* y *Phytophthora cactorum*), cuerpos reproductores o "hyphal swellings" (caso de *P. intermedium*) o macro y microconidias (caso de *Fusarium* spp.).

Las bandejas o las macetas se dispusieron en cámara de cultivo a una temperatura de 22±2 °C durante el día y 18±2 °C durante la noche, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 h. de oscuridad. La humedad relativa del aire se situó en torno al 83% (detalles en 3.2.4.4).

Los datos que se recogieron fueron el número de plantas muertas en relación al total de plantas nacidas cada 5 días, para el primer ensayo, y cada 7 días, para el segundo durante 6 semanas en total. Se incluyeron los correspondientes controles sanos. Cuando fue posible, se comprobó la recuperación del patógeno inoculado a partir de las raíces de las plantas muertas (cuando la raíz no estaba totalmente destruida y se podía recuperar del sustrato y manipular), de la forma expuesta en el epígrafe 3.2.4.5.

4.2.3.2 Ensayo de virulencia comparada

Con los tres aislados que mostraron mejores aptitudes para la preparación del inóculo (mayor producción de esporas) o mayor virulencia en los ensayos de determinación de patogenicidad (CA013 de *P.irregulare*, CL039 de *P.paroecandrum* y CM018 de *P.intermedium*) diseñamos otro ensayo en el que inoculamos plántulas de *Cupressus arizonica* en semillero, con la misma concentración de cada uno de los tres, sometiéndolos a las mismas condiciones ambientales controladas (termoperíodo y fotoperíodo).

Todos los materiales y técnicas utilizados en este ensayo se ajustan completamente a los materiales y métodos generales expuestos en los epígrafes 3.1 y 3.2.4.

La suspensión de esporas se ajustó a la concentración de $4{,}2.10^4$ esporas/ml para los tres aislados. Aplicando 5 ml de dichas suspensiones obtuvimos una concentración final de inóculo de 487 propágulos/gramo de suelo seco (cfu/g.ss). La inoculación se llevó a cabo cuando las plántulas contaban con 4 semanas de edad desde la emergencia (seis semanas desde la siembra).

Durante el ensayo las plántulas se mantuvieron en la cámara de cultivo (consultar 3.2.4.4) con unas temperaturas medias de máximas y mínimas de 23,7-19,0 °Celsius y humedad relativa del 85% (Tabla 4.2).

Tabla 4.2.-Datos de temperaturas máximas y mínimas registradas en la cámara de cultivo en el ensayo realizado con los aislados patógenos de *P.irregulare, P.intermedium* y *P.paroecandrum* inoculados sobre plantas de *Cupressus arizonica* en semillero para la misma concentración de inóculo.

ddi	Tmin.	Tmax.
0	17	22
7	17	24
14	**18**	24
21	20	23
28	21	24
35	21	25

ddi= días desde inoculación.

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas: 23,7±1,0
Temperatura media de las minimas: 19,0±1,9
Humedad Relativa(%): 85,0±7,5

Se dispusieron tres repeticiones por tratamiento; se ensayaron los tres hongos y se acompañaron de un control sano. El número medio de plantas por repetición es de 50. Cada semana, durante las cinco que duró el ensayo, registramos el número de plantas muertas en relación al número total de plantas nacidas; valores con los que calculamos la mortalidad acumulada. Al finalizar el ensayo, recuperamos las plantas supervivientes a las inoculaciones y tomamos los valores de longitud de raíz principal y tallo; y además, a partir de una muestra de 5 plantas por tratamiento, comprobamos la recuperación del patógeno inoculado, todo ello de la manera expuesta en el apartado 3.2.4.5 visto en 3.MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.

4.2.3.3 Influencia de la concentración de inóculo

Para determinar la concentración de la suspensión del inóculo más apropiada para su utilización en el resto de los ensayos se planeó un ensayo previo. En él se evaluaron dos aislados patógenos con tres concentraciones de cada uno de ellos. Los hongos ensayados fueron el CA013 de *P.irregulare* y el CL039 de *P.paroecandrum*. Las concentraciones

ensayadas fueron: $3{,}29.10^4$; $6{,}94.10^4$ y $11{,}39.10^4$ esporas/ml para CA013; y $2{,}8.\ 10^4$, $7{,}3.\ 10^4$ y $11{,}6.\ 10^4$ esporas/ml para CL039.

Se inocularon plántulas de *Cupressus arizonica* Greene a las dos semanas de producirse la emergencia de las semillas. Tanto los materiales empleados (sustrato, semillas, alvéolos) como los métodos de siembra, preparación de inóculos, inoculación e incubación, siguieron las pautas expuestas en el capítulo anterior 3.MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES (consultar los apartados 3.1 y 3.2.4).

Las concentraciones finales de inóculo, después de la aplicación de 5 ml de las suspensiones preparadas al sustrato, son: 382, 805 y 1.322 cfu ó propágulos/gramo de suelo seco (cfu/g.ss) para el aislado CA013 y 325, 847 y 1346 cfu/g.ss para el aislado CL039.

Las condiciones ambientales particulares de la cámara durante la incubación de este ensayo oscilaron entre los valores medios de temperaturas máximas y mínimas de 23,2-17,2 °Celsius y humedad relativa media del 83%, según se detalla en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3.-Datos de temperaturas máximas y mínimas registradas en la cámara de cultivo en el ensayo realizado con los aislados patógenos de *P.irregulare* y *P.paroecandrum* inoculados sobre plantas de *Cupressus arizonica* en semillero para tres concentraciones de inóculo.

ddi	Tmin(°C).	Tmax(°C)	HR(%)
0	14,5	22,5	88
7	18	**24**	**86**
14	18	**23**	**85**
21	18	**23**	**85**
28	17,5	23,5	71

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)

Temperatura media de las maximas: 23,2±0,6
Temperatura media de las minimas: 17,2±1,5
Humedad Relativa (%): 83,0±6,8

La experiencia se planteó como un ensayo factorial con dos factores: "hongo inoculado" y "concentración del inóculo". Se consideraron 6 tratamientos (combinación de dos hongos y tres concentraciones) y un control sin inocular, disponiendo 4 repeticiones para el control y dos repeticiones para el resto de los tratamientos. El número medio de plantas por repetición ha sido de 44.

Se registraron datos de mortalidad acumulada, a través del número de plantas muertas cada semana respecto al total de plantas nacidas, durante 4 semanas. Al final de dicho período, se recogieron las plantas supervivientes a las inoculaciones y se recogieron las medidas de longitud de raíz principal y tallo y, por otro lado, los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea.

Asimismo, al final del ensayo se tomaron notas sobre los daños aparentes en las raíces de las plantas supervivientes, según la siguiente escala visual:

0 = raíz totalmente sana
1 = pequeños puntos necróticos de muy escasa extensión
2 = zonas necróticas que afecten a menos del 25% de la superficie
3 =zonas necróticas que se extiendan desde un 25% hasta un 50%
4 = necrosis que afecte desde un 50% hasta un 75%
5 = raíz afectada en más de un 75% de su superficie

Se comprobó también la recuperación del patógeno inoculado a partir de las raíces, tanto de las plantas muertas como de las supervivientes.

Todos los parámetros evaluados se recogieron de la forma expuesta en el apartado 3.2.4.5 y se evaluaron estadísticamente siguiendo lo especificado en 3.2.6.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO

Estudiamos un total de 16 viveros repartidos por toda la región dedicados principalmente a la producción de árboles y arbustos de ornamento en contenedor (Tabla 13.3.1). Asimismo, tomamos en consideración muestras de otras procedencias, tales como parques y jardines, tanto públicos como privados, que nos hicieron llegar sus plantas o que, a su requerimiento, visitamos (Tabla 13.3.1). Las muestras tomadas en zonas de semilleros o estaquillado presentaban, en su mayoría, síntomas de enfermedad por problemas de raíz o cuello ("damping-off" ó "peste de los semilleros") con elevada probabilidad de estar producidas por algún tipo de hongo del suelo. Las muestras tomadas de plantas adultas procedían mayoritariamente de árboles y arbustos en los que la enfermedad había progresado, produciendo marchitez y clorosis de las hojas, raíces secundarias de escaso desarrollo, etc.

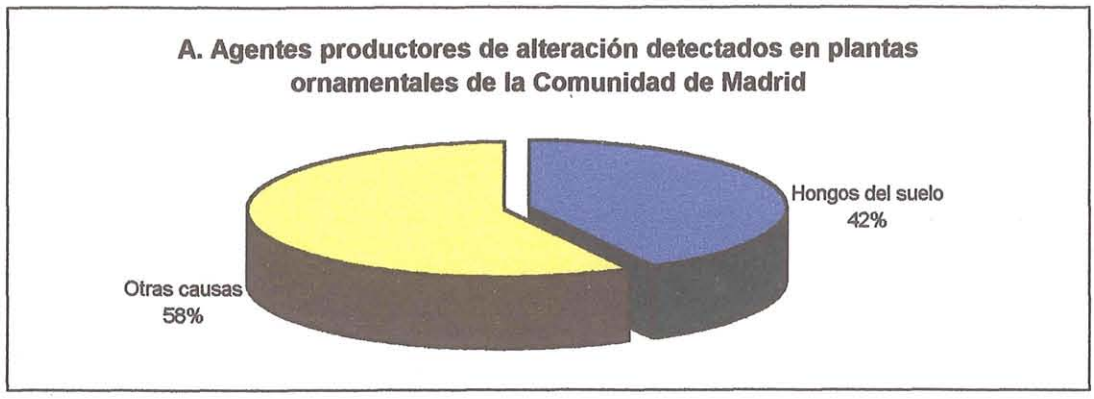
Desde octubre de 1991 hasta marzo de 1995, estudiamos 41 géneros vegetales distintos, fundamentalmente árboles y arbustos (Tabla 13.3.2).

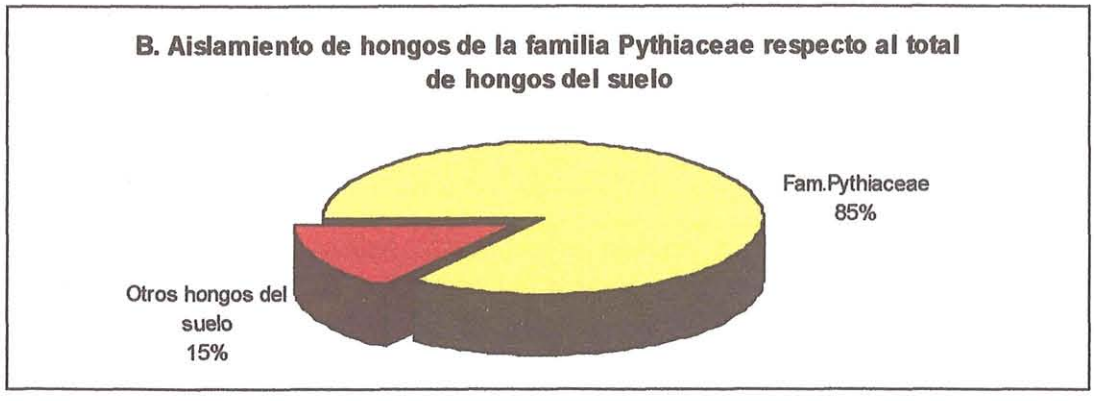
Las plantas enfermas eran en su mayoría de los géneros *Cupressus* y *Pyracantha*, pero también resultaron afectadas especies de otros géneros (Tabla 13.3.2). En total estudiamos 125 muestras de plantas ornamentales, de las que un 66% (74 muestras) procedían de vivero (Tabla 13.3.1).

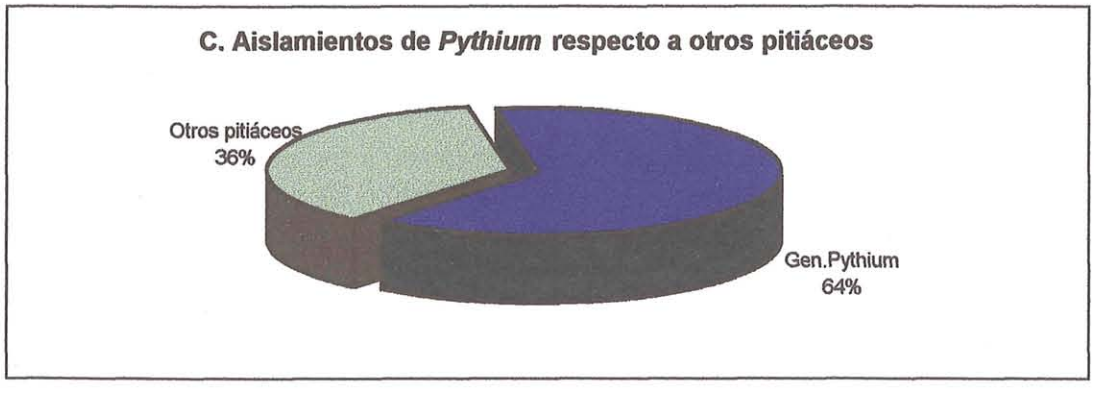
Los resultados del estudio cuantitativo indican que de un 42% de las muestras se aislaron hongos fitopatógenos del suelo (Fig.4.1.A), y clasificables dentro de la familia *Pytiaceae* un 85% de estos (Fig.4.1.B). Además. el género más aislado fue *Pythium* con una frecuencia del 64% de los casos debidos a pitiáceos (Fig.4.1.C); y dentro de él, tres especies muy polífagas: *P. irregulare* Buisman (32%), *P. paroecandrum* Drechsler (21%) y *P. intermedium* de Bary (13%), por este orden de importancia (Fig.4.1.D). Es decir, en el 66% de los casos debidos a *Pythium* se aislaron estas tres especies , frente al 34% restante constituido por otras especies de *Pythium*, el género *Phytophthora* y otros aislados que no se llegaron a clasificar hasta nivel de especie.

En algunos casos *Pythium* sp. apareció acompañado de *Fusarium* sp. Del total de casos debidos a *Pythium* encontramos un 30% de asociaciones parasitarias con otros hongos del suelo. En el 70% de los casos se aisló *Pythium* con carácter único. Las asociaciones encontradas fueron las siguientes:

Thielaviopsis + *Pythium*: 5% (del total de casos debidos a *Pythium*)
Rhizoctonia + *Pythium*: 2% (del total de casos debidos a *Pythium*)
Fusarium + *Pythium*: 23% (del total de casos debidos a *Pythium*).







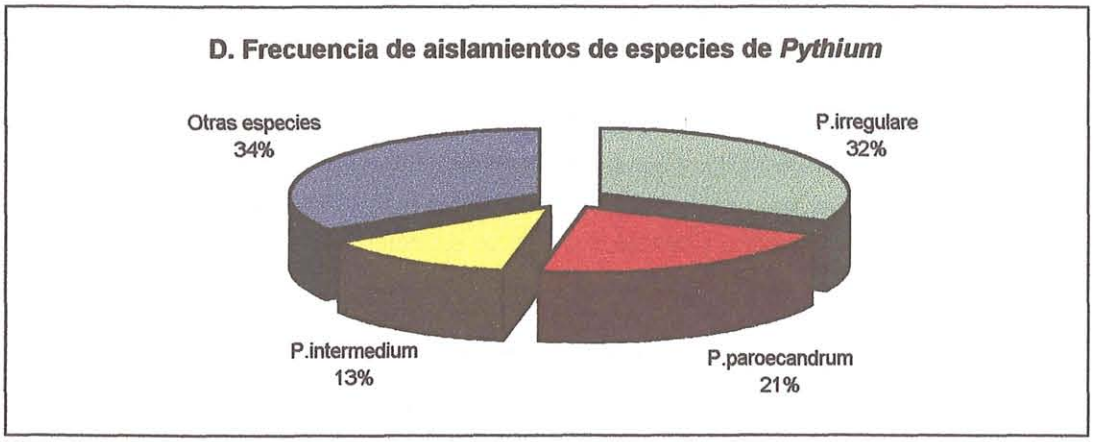


Fig.4.1.- Relación comparativa de hongos patógenos encontrados en plantas ornamentales enfermas de la Comunidad de Madrid durante los años 1991 a 1995.

En su mayor parte las plantas afectadas por pitiáceos procedían de semillero, estaquillado o primer año de cultivo en contenedor, en los meses posteriores al trasplante y los síntomas aparecían coincidiendo con épocas de temperaturas frescas y humedad elevada en el sustrato (febrero-marzo y octubre-noviembre) (Anejo 13.2.DATOS METEOROLÓGICOS). Los huéspedes sensibles al ataque de *Pythium* pertenecían a muy variados géneros vegetales. En general, las plantas afectadas fueron plantas leñosas de exterior (Anejo 13.3.2.-GENEROS VEGETALES AFECTADOS POR PITIÁCEOS).

La sintomatología de las plántulas de semillero enfermas consistía fundamentalmente en fallos en nascencia (marras) (Fig.4.2.A), retrasos en el crecimiento y alteraciones en raíz (Fig.4.3.C, 4.3.D, 4.3.H y 4.3.I), podredumbres y necrosis en raíces y cuello y estrangulamientos a nivel del cuello y sistema radicular (Fig.4.3.E y 4.3.F), colapso de las jóvenes plantas y, finalmente, la muerte (Fig. 4.3.A y 4.3.B). En plantas de más edad los síntomas son muy variados, dependiendo de la gravedad de la enfermedad y van desde marchitez, falta de vigor, clorosis progresiva, retraso en el crecimiento, defoliación, muerte de brotes y hojas hasta el colapso total de la planta (Fig. 4.2.B, 4.2.C, 4.2.D, 4.2.E y 4.2.F).

En algunos casos, cuando las condiciones ambientales habían dejado de ser favorables al patógeno, la planta pudo reponerse y superar la enfermedad, siempre que ésta no estuviera muy avanzada (Fig.4.3.G).

4.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

La identificación de los aislados se realizó atendiendo a los caracteres morfológicos descritos por VAN DER PLAATS-NITERINK (1981). Como ya se ha indicado en el apartado anterior, tres fueron las especies de *Pythium* identificadas con mayor frecuencia: *P. irregulare* Buisman, *P. intermedium* de Bary y *P. paroecandrum* Drechsler. También se detectó *Phytophthora cactorum* (Lebert & Conh) Schroter en plantas de *Crataegus* sp. y *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan sobre *Lavandula* sp (Tabla 4.4).

Veintiuno de los aislados encuadrados por nosotros en los géneros *Pythium* y *Phytopthora* fueron enviados al International Mycological Institute (IMI, Egham, Reino Unido) para la confirmación de su completa clasificación en género y especie. Once de ellos fueron agregados a la colección micológica del IMI y allí se conservan. Varios aislados no pudieron ser identificados a nivel de especie. El IMI clasificó uno de los aislados enviados como *Pythium* sp. grupo G. Como señalan HENDRIX Y CAMPBELL (1968) posiblemente se trate de individuos aberrantes de especies conocidas o nuevas especies aún sin clasificar.

Las características concretas del aislado de *Phytophthora* empleado en los ensayos de patogenicidad y de los tres aislados de *Pythium* utilizados en los ensayos del presente trabajo son los siguientes[1]:

[1] Las características generales de las especies se describieron en 1.INTRODUCCIÓN GENERAL, en el apartado 1.5.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

Tabla 4.4.-Hongos de la Familia *Pythiaceae* y del género *Fusarium* aislados de plantas ornamentales de la Comunidad de Madrid durante el período del estudio y que se mantienen en micoteca.

Aislado cod. Id.	Especie	Procedencia	Huésped	Fecha aismto	Observaciones
CR002	*P. cactorum*	Viveros Puerta de Hierro	*Crataegus sp.*	11/91	
PN003	*Phytophthora sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	01/93	irrecuperable
PN004	*P.intermedium*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	10/92	
PR005	*Pythiaceae*	Vivero La Veguilla	*Pyracantha sp.*	01/93	no identificado
TH006	*P.irregulare*	Vivero Drago	*Thuja sp.*	12/91	
PN007	*Phytopthora sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	02/93	
RO008	*Pythium sp.*	Vivero La Veguilla	*Rosmarinus sp.*	01/93	irrecuperable
LA009	*Pythiaceae*	Vivero La Veguilla	*Lavandula sp.*	02/93	no identificado
PN010	*P.irregulare*	Vivero La Veguilla	*Pyracantha sp.*	02/93	
PN011	*P.paroecandrum*	Vivero La Veguilla	*Pyracantha sp.*	02/93	
PN012	*Phytophthora sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/92	
CA013	*P.irregulare*	Viveros Puerta de Hierro	*C.arizonica*	02/92	
CA0131	*P.irregulare*	Viveros Puerta de Hierro	*C.arizonica*	11/92	
CA014	*P.irregulare*	Viveros Puerta de Hierro	*C.arizonica*	07/92	
CA015	*Pythium* grupo G	Viveros Puerta de Hierro	*C.arizonica*	07/92	
CR016	*Pythiaceae*	Viveros Madrid 2000	*Crataegus sp.*	12/91	no identificado
PN017	*Phytophthora sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/92	cont.bacterias
CM018	*P.intermedium*	Viveros Puerta de Hierro	*C.macrocarpa*	10/92	
PN019	*P.paroecandrum*	Vivero La Veguilla	*Pyracantha sp.*	10/92	
LA020	*P.nicotianae*	Viveros Puerta de Hierro	*Lavandula sp.*	11/91	
TH021	*P.irregulare*	Viveros Drago	*Thuja sp.*	10/91	
TH022	*P.irregulare*	Viveros Drago	*Thuja sp.*	11/91	
TH023	*P.irregulare*	Viveros Drago	*Thuja sp.*	10/91	
TH024	*P.irregulare*	Viveros Drago	*Thuja sp.*	12/91	
TH025	*P.irregulare*	Viveros Drago	*Thuja sp.*	12/91	
TH026	*P.irregulare*	Viveros Drago	*Thuja sp.*	12/91	
HI027	*Pythiaceae*	Viveros Puerta de Hierro	*Hedera sp.*	03/92	no identificado
ES028	*Pythiaceae*	Viveros Madrid 2000	*Escallonia sp.*	12/91	no identificado
CM029	*P.paroecandrum*	Viveros San Martín	*C.macrocarpa*	03/93	
CL030	*Pythium sp.*	Viveros San Martín	*C. leylandii*	03/93	
CA031	*P.paroecandrum*	Vivero San Martín	*C. arizonica*	02/93	
PN032	*Pythium sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/93	
PR033	*P.paroecandrum*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/93	
PR034	*Pythium sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/93	
PR035	*Pythiaceae*	Jardín-Villaviciosa de Odón	*Pyracantha sp.*	07/93	no identificado
TX036	*P.paroecandrum*	Madrid (Pº Prado)	*Taxus sp.*	09/92	
CL038	*P.paroecandrum*	Vivero El Encín	*C.leylandii sp.*	10/92	
CL039	*P.paroecandrum*	Vivero El Encín	*C.leylandii sp.*	10/92	
CA040	*P.irregulare*	Viveros Puerta de Hierro	*C.arizonica*	12/91	
PR041	*Phytopthora sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/94	
PR042	*Pythium sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/94	
PR043	*Pythium sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/94	
S044	*P.intermedium*	Viveros Puerta de Hierro	suelo	04/94	

Aislado cod. Id.	Especie	Procedencia	Huésped	Fecha aismto	Observaciones
S045	*P.intermedium*	Viveros Puerta de Hierro	suelo	04/94	
PP046	*Pythium sp.*	Jardín- La Cabrera	*P.pinea*	03/94	
PP047	*Pythium sp.*	Jardín- La Cabrera	*P.pinea*	03/94	
PP048	*Phytophthora sp.*	Jardín- El Encín	*Pinus sp.*	03/94	
PE049	*Pythiaceae*	Vivero Brunete	*Petunia sp.*	07/94	no identificado
CS050	*Pythiaceae*	Vivero Enseñat	*C.sempervirens*	07/94	no identificado
GY051	*Phytophthora sp.*	Vivero El Encín	*Gypsophylla sp.*	03/95	
F001	*Fusarium sp.*	Jardín- El Boalo	*Cupressus sp.*	01/93	
F002	*Fusarium sp.*	Jardín- El Boalo	*Cupressus sp.*	01/93	
F003	*Fusarium sp.*	Vivero La Veguilla	*Pyracantha sp.*	01/93	
F004	*Fusarium sp.*	Vivero San Martín	*C.macrocarpa*	02/93	
F005	*Fusarium sp.*	Vivero San Martín	*C.macrocarpa*	02/93	
F006	*Fusarium sp.*	Vivero San Martín	*C.arizonica*	02/93	
F007	*Fusarium sp.*	Vivero San Martín	*C.leylandii*	02/93	
F008	*Fusarium sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/93	
F009	*Fusarium sp.*	Viveros Puerta de Hierro	*Pyracantha sp.*	03/93	

Se representa el código de identificación del aislado, el género y la especie (en su caso), la procedencia, la planta o el medio a partir del que se aisló, la fecha de aislamiento y otras observaciones (si el aislado se contaminó con bacterias o si no pudo ser identificado).

***Pythium irregulare* Buisman (CA013):** Presenta oogonios intercalares y terminales con algunas proyecciones cónicas en forma de "dedo", oosporas apleróticas de 15-18 µm de diámetro con una pared de 0,5 a 1,0 µm de espesor, y 1-2 anteridios, pedunculados, preferentemente monoclinos y, con menor frecuencia, diclinos. Algunos esporangios esféricos terminales e intercalares. Esta especie está muy relacionada con *P.paroecandrum*, incluso puede que ambas especies formen un complejo de especies asociadas. Este aislado forma parte de la colección de cultivos del IMI con el número 354419 (Fig.4.4.A, 4.4.B y 4.4.C).

***Pythium paroecandrum* Dreschler (CL039):** Este aislado no forma esporangios sino algunos cuerpos reproductores ("hyphal swellings") intercalares de aproximadamente 30 µm de diámetro. Presenta oogonios predominantemente intercalares, aislados o agrupados en cadenas cortas de 3 ó 4. Los anteridios se presentan solos, adheridos al oogonio, encorvados, monoclinos y pedunculados a una distancia de 20 a 30 µm del oogonio. Las oosporas son apleróticas, de pared lisa, de 16 a 18 µm de tamaño con una pared de 0,5 a 1,5 µm de espesor con un ooplasto central prominente. Este aislado es parecido a *Pythium connatum* Yu (Fig.4.4.D, 4.4.E, 4.4.F, 4.4.G).

***Pythium intermedium* de Bary (CM018):** Forma cadenas cortas de 2 a 5 cuerpos reproductores ("hyphal swellings"), caducos e intercalares y de 20 a 25 µm de diámetro. No produce esporangios ni oogonios o anteridios. Este aislado se mantiene en la colección micológica del IMI con el número 356131 (Fig.4.3.H).



Figura 4.2. Síntomas de la enfermedad producida por *Pythium* sp. en árboles y arbustos ornamentales. A) "Damping-off" de pre-emergencia en semillero de *Robinia pseudoacacia*; B) "Damping-off" de post-emergencia en *Pyracantha* sp., después del transplante. C) Idem en *Cupressocyparis leylandii* D) Detalle de lo anterior, pudiéndose apreciar los daños en la zona basal del tallo; E) Gradación de daños en *Cupressus arizonica.* F) Síntomas en planta adulta de *Cupressus arizonica.*

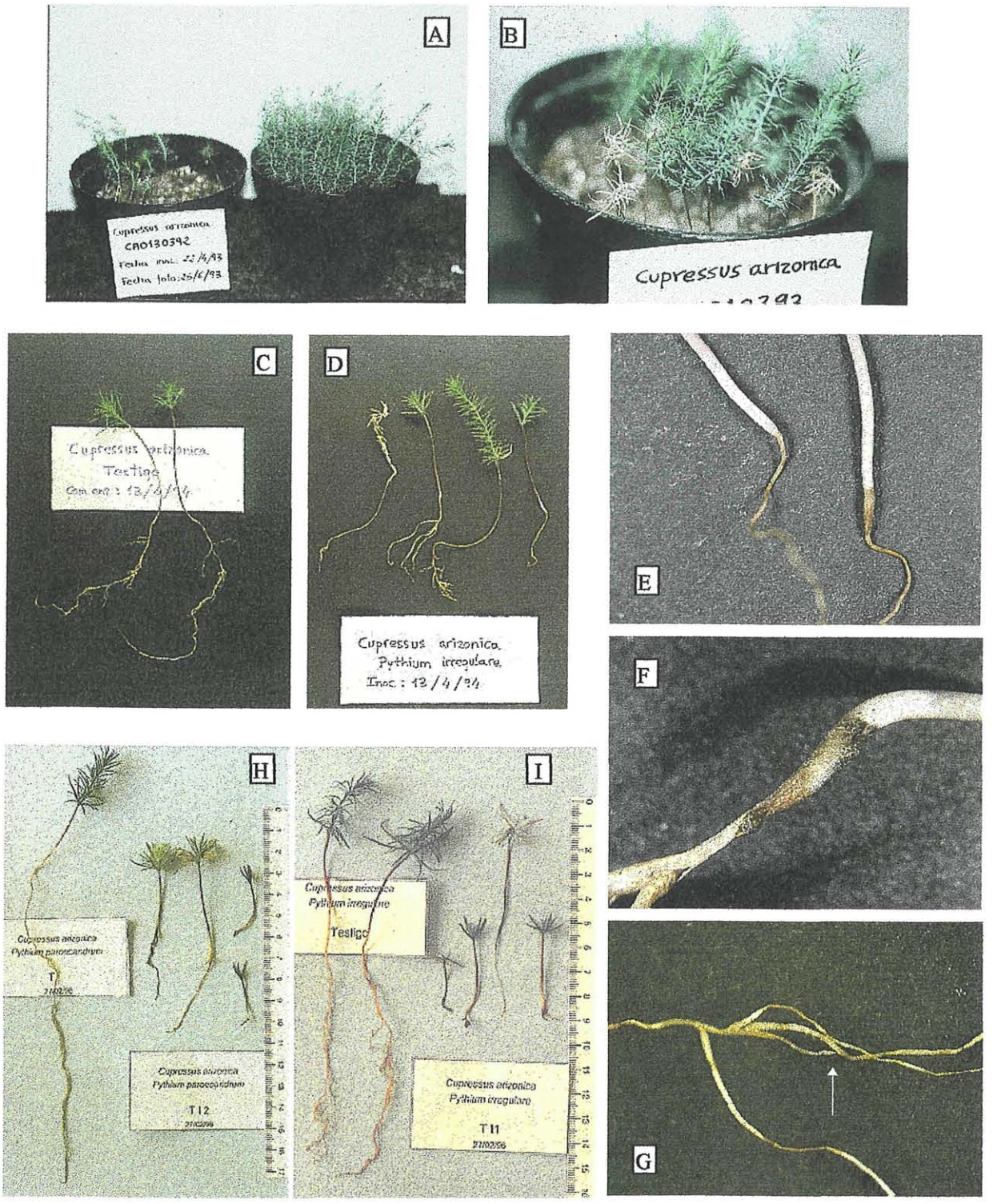


Figura 4.3. Síntomas producidos por *Pythium* spp. en *Cupressus arizonica* Greene. A: Muerte de plántulas en post-emergencia producida por *P. irregulare* (izqda.), a la derecha control sano; B: Detalle de las plántulas afectadas; C y D: Alteraciones en raíz provocadas por *P. irregulare* (C), comparadas con raíces sanas (D); E y F: Detalle de necrosis y podredumbres radiculares; G: Proliferación de nuevas raíces por encima del punto de ataque (indicado por la flecha); H: Podredumbres radiculares y reducción en el crecimiento producido por *P. paroecandrum,* a la izquierda planta sana (T) y a la derecha plantas inoculadas (TI2); I: Idem con *P. irregulare*, a la izquierda planta sana (Testigo) y a la derecha plantas inoculadas (TI1).

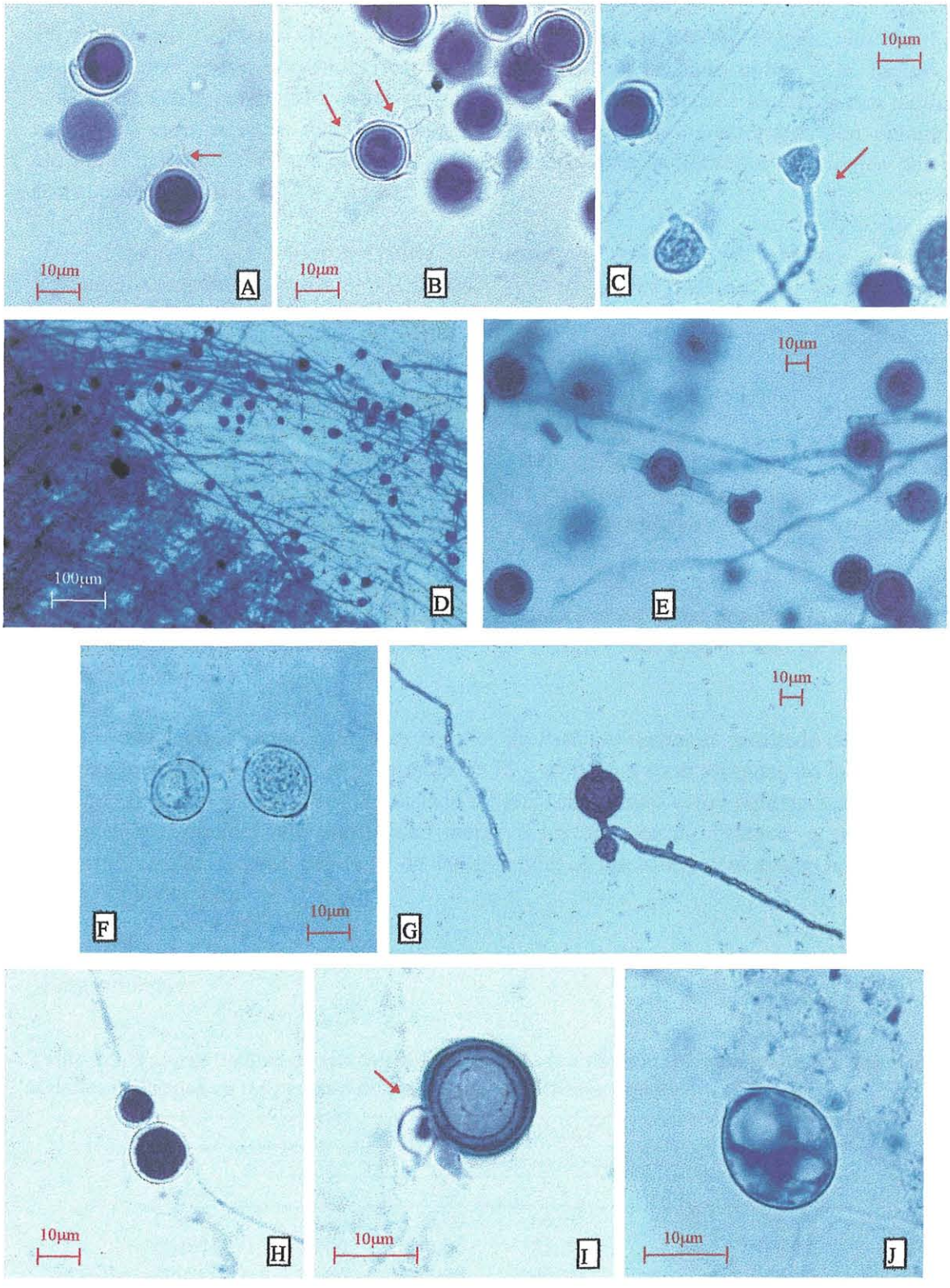


Figura 4.4. Microfotografías de las especies estudiadas. *Pythium irregulare*: A, esporangio y oosporas, con la proyección característica en forma de dedo; B, oospora con dos anteridios de inserción apical; C, esporangio intercalar con tubo de germinación. *P. paroecandrum*: D, micelio y esporas; E, oogonios intercalares; F, esporangios globosos; G, cuerpos reproductores intercalares con proceso de germinación. *P. intermedium*: H, cadena corta de dos cuerpos reproductores intercalares; *Phytophthora cactorum*: I, oospora aplerótica con anteridio paragino; J, esporangio ovoide papilado.

***Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schröter (CR002):** Forma con facilidad esporangios esféricos u ovoides, papilados, caducos con pedicelo corto, y se forman en simpodios. Los esporangióforos son de proliferación externa. Produce oogonios con facilidad en cultivo puro, a veces con coloración amarillenta. Todos los anteridios son paraginos. Oosporas apleróticas. Este aislado también se mantiene en la colección micológica del IMI con el número 356133 (Fig.4.3.I y J).

Nosotros, por nuestra parte, conservamos más de 50 aislados diferentes, fundamentalmente de hongos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora,* que forman parte de nuestra colección micológica (Tabla 4.4).

4.3.3 DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD

En ambos ensayos queda demostrada la patogenicidad de todos los aislamientos del género *Pythium* y del aislado de *Phytophthora*; por el contrario, no conseguimos reproducir la enfermedad con los aislamientos de *Fusarium.*

En el primer ensayo, los 8 aislados evaluados consiguieron producir la muerte de las plantas en una cantidad cifrada entre el 70 y algo más del 90% a los 43 días de la inoculación (Fig.4.5 y Tabla 4.5).

En el segundo ensayo, los tres aislados de *Pythium* repiten el resultado del primero al alcanzar mortalidades comprendidas entre el 78 y el 94% a las 6 semanas de la inoculación (42 días) (Fig. 4.6 y Tabla 4.6). El aislado CR002, clasificado como perteneciente al género *Phytophthora*, provocó una mortalidad menor a los aislados de *Pythium;* a pesar de ello consiguió afectar a cerca del 50% de las plántulas a las 6 semanas desde la inoculación (Fig.4.6 y Tabla 4.6).

En ambos ensayos se recuperó el hongo inoculado de las raíces del 100% de las plantas muertas.

Tabla 4.5.-Valores medios de mortalidad acumulada (en porcentaje) provocada por los distintos aislados utilizados en las pruebas de patogenicidad. Primer ensayo.

	Mortalidad acumulada (%)				
	Tiempo (días desde inoculación)				
Aislados	5	12	29	35	43
CA040	30,00	50,00	66,70	85,70	93,30
CM018	40,00	50,00	85,70	90,90	90,90
CA0131	28,60	42,90	60,00	86,60	86,70
CA013	25,00	53,90	66,60	83,30	84,60
PN004	**0,00**	11,10	77,70	90,90	90,90
CL039	**8,30**	40,00	50,00	66,60	73,30
CA031	7,70	15,40	50,00	66,70	69,23
TX036	0,00	22,20	46,15	61,50	**68,75**
Control	0,00	0,00	0,00	7,10	14,29

Tabla 4.6.-Valores medios de mortalidad acumulada ± su error típico, provocada por los distintos aislados utilizados en las pruebas de patogenicidad. Segundo ensayo.

	Mortalidad acumulada (%)					
	Tiempo (días desde inoculación)					
Aislados	7	14	21	28	35	42
CA013	49,90±8,69	88,97±3,82	91,20±2,06	94,03±1,88	94,07±1,88	94,07±1,88
CM018	7,43±0,98	20,83±2,20	71,57±5,51	76,00±5,24	76,07±3,05	78,33±4,06
CL039	11,47±3,06	30,73±9,54	63,27±5,78	68,83±7,34	69,60±6,62	83,40±5,01
CR002	0,00±0,00	1,43±1,43	39,50±24,45	46,27±23,31	48,00±23,15	49,03±22,37
Control	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,30±1,42	4,30±1,42

4.3.4 ENSAYO DE VIRULENCIA COMPARADA

4.3.4.1 Incidencia de enfermedad: Mortalidad

La Figura 4.7 representa gráficamente los valores medios de mortalidad acumulada para las cinco semanas que duró el ensayo.

El estudio estadístico de la mortalidad se abordó de dos formas: analizamos los valores de mortalidad acumulada para cada tiempo considerado (manteniendo el tiempo constante) y, por otro lado, estudiamos la incidencia de la enfermedad para el conjunto de todos los tiempos, a través de la creación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) de la forma explicada en el epígrafe 3.2.6.4.

En el análisis de varianza mediante la prueba F de Snedecor aplicado a todos los tratamientos, incluido el control sano, observamos diferencias significativas, al nivel de significación del 5%, para todos los tiempos considerados en el ensayo (Tabla 4.7).

Tabla 4.7.-Valores del Análisis de varianza según la prueba F de Snedecor, aplicada a los datos de mortalidad acumulada para los tres aislados: CA013 de *P.irregulare*, CM018 de *P.intermedium* y CL039 de *P.paroecandrum*, incluyendo en el análisis el control sin inóculo, inoculados sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

	Variable: mortalidad acumulada	
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(3,8)	p
1	6,301417	0,016787
2	10,172498	0,004181
3	29,400770	0,000114
4	41,116482	0,000033
5	16,557989	0,000859

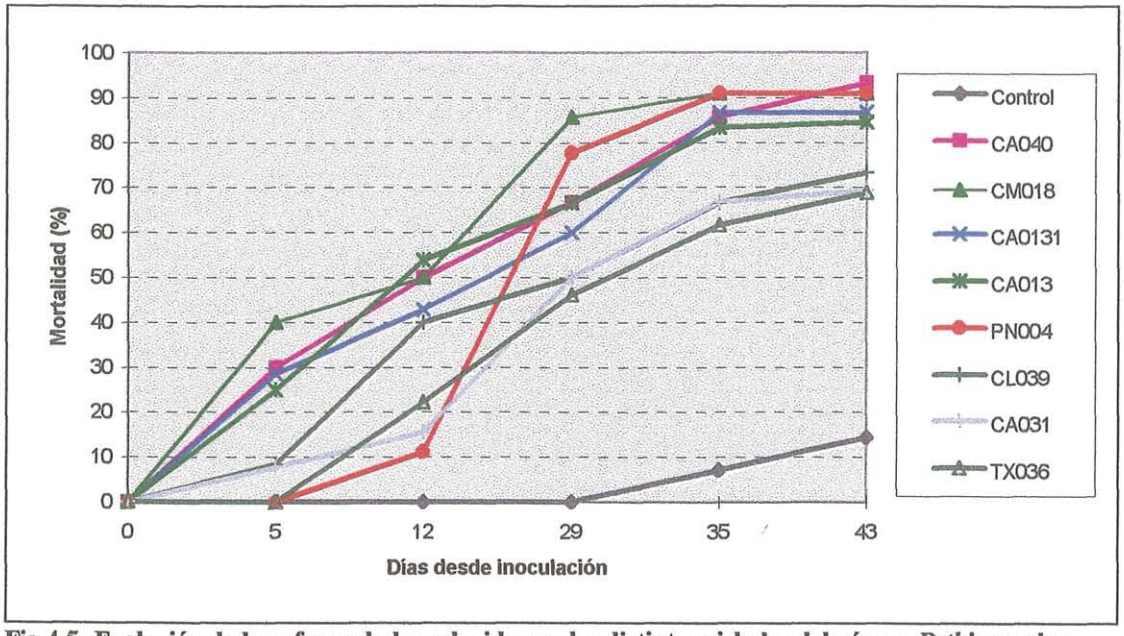


Fig.4.5.-Evolución de la enfermedad producida por los distintos aislados del género *Pythium* sobre plántulas de *Cupressus arizonica* Greene.

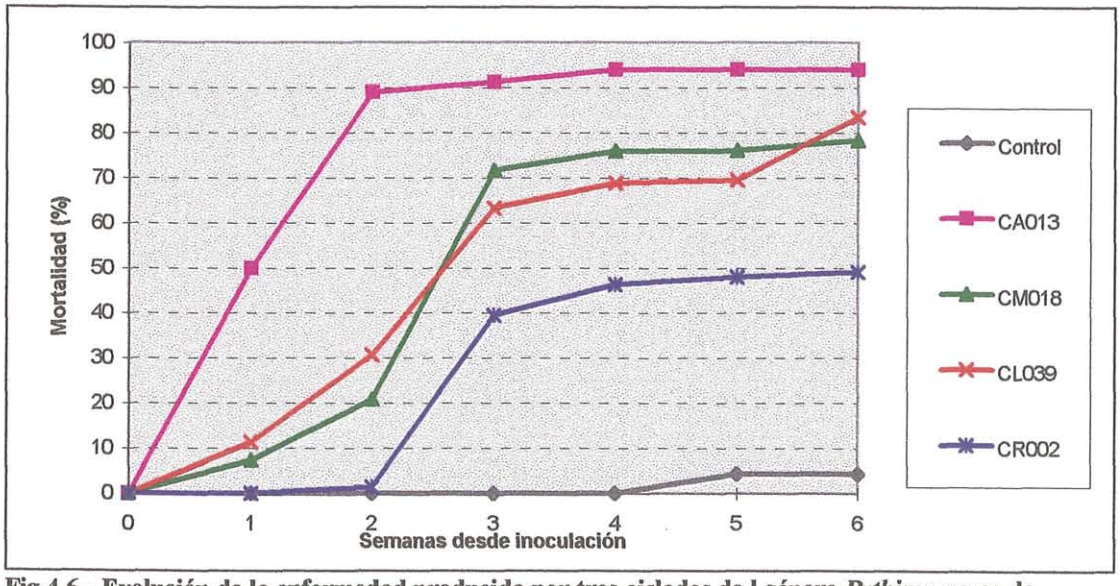


Fig.4.6.- Evolución de la enfermedad producida por tres aislados de l género *Pythium* y uno de *Phytopthora* sobre plántulas de *Cupressus arizonica* Greene.

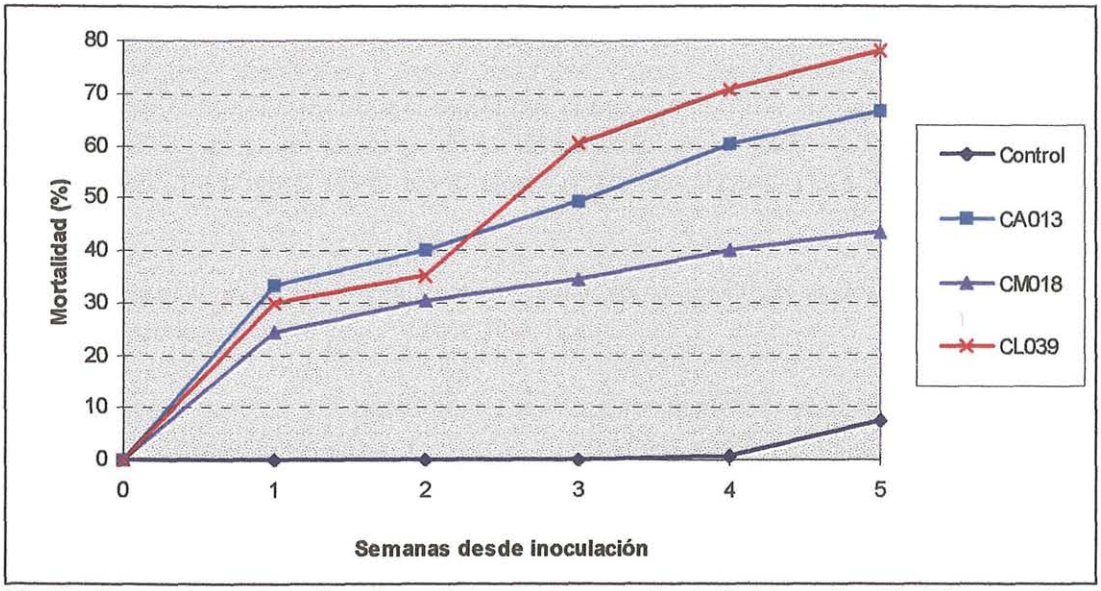


Fig.4.7.-Curvas de progreso de enfermedad para tres especies de Pythium a igualdad de concentración de inóculo.

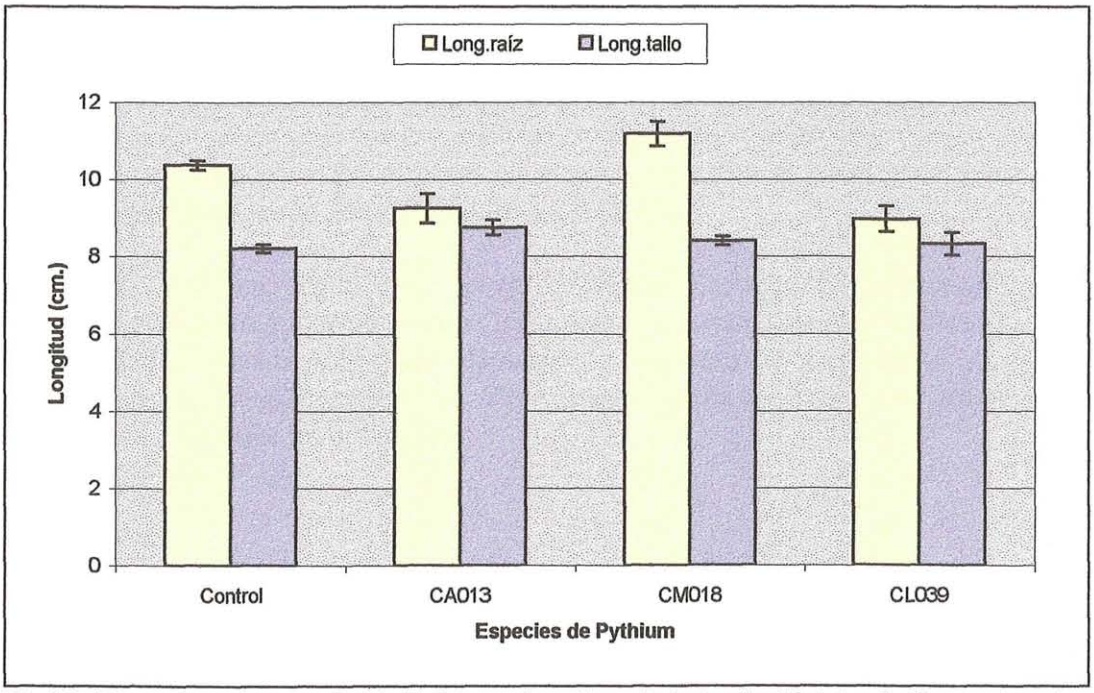


Fig.4.8.-Efecto de varias especies de Pythium sobre el crecimiento de plántulas de *C.arizonica* a igualdad de concentración de inóculo.

Detallando, continuamos con la comparación de las medias de los tratamientos empleando los tests LSD, Duncan y Scheffé, con objeto de identificar las comparaciones significativamente diferentes. Según esto, en la primera semana desde la inoculación (tiempo 1) no hay diferencias entre los tres hongos para ninguno de los tests (Tabla 13.4.1). El control sin inocular es distinto a los tres inóculos según LSD (Tabla 13.4.1). Para Duncan el tratamiento con CA013 no se distingue significativamente del control, aunque con una probabilidad que se aproxima mucho al límite definido del 5% (p= 0,0597) (Tabla 13.4.1). Por el contrario, para Scheffé el único tratamiento distinto al control es CA013 (p= 0,0312) (Tabla 13.4.1).

En el tiempo 2 los tres tests coinciden en la igualdad entre los tres aislados y en su diferencia con el control sano (Tabla 13.4.1).

Los tiempos 3 y 5 registran los mismos resultados: el control sigue siendo distinto a todos los tratamientos (Tabla 13.4.1) y los inóculos iguales entre sí, con la salvedad de la comparación de los aislados CL039 y CM018 mediante el test LSD (Tabla 13.4.1).

En el tiempo 4 se repite el resultado de los tiempos 3 y 5, pero en este caso el test de Duncan coincide con LSD en marcar las diferencias entre los aislados CL039 y CM018 (Tabla 13.4.1).

En segundo lugar, el análisis de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd), que se realiza también mediante el ANOVA F para todos los tratamientos, incluido el control, remarca la existencia de diferencias significativas ($p<0,05$) (Tabla 13.4.2).

Por su parte, con los tres tests de comparación múltiple de medias, LSD, Duncan y Scheffé, se obtiene el mismo resultado; esto es, no existen diferencias significativas entre la enfermedad producida por los tres aislados considerados (Tablas 4.8 y 13.4.3) y, además, los tres son significativamente distintos al control sano, con la única excepción del aislado CM018 analizado según Scheffé (Tablas 4.8 y 13.4.3).

En resumen, según estos resultados nos reafirmamos en la patogenicidad de los aislados estudiados y apreciamos que los tres se comportan de la misma forma en cuanto a la mortalidad producida sobre las plántulas de semillero de *C.arizonica* sometidas a las condiciones ambientales del ensayo. Sin embargo, parece que el aislado CM018 muestra una virulencia menor que los otros dos.

Tabla 4.8.-Comparación de la variable AUDPC para los tres hongos inoculados sobre plantas de *Cupressus arizonica* Greene a una misma concentración de inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p< 0,05) según LSD.

Inóculo	AUDPCstd (%)
P.irregulare	43,21 ± 6,35 a
*P.intermedium**	30,12 ± 8,35 a
P.paroecandrum	47,10 ± 8,28 a
Control	0,87 ± 0,65 b

*Según Scheffé el aislado CM018 no es distinto del control.

4.3.4.2 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes de raíz y tallo

Los valores medios para ambas variables se exponen gráficamente en la Figura 4.8.

El análisis de varianza aplicando la prueba F de Snedecor para las variables "longitud de raíz principal" y "longitud de tallo" detecta diferencias significativas, al nivel de confianza del 95%, solamente en la primera de ellas (Tablas 4.9 y 13.4.4).

La comparación múltiple de medias para la variable "longitud de raíz principal" aplicando los tests LSD, Duncan y Scheffé anuncia la ausencia de diferencias entre el aislado CM018 y el control sano (Tablas 4.9 y 13.4.5), pero también las diferencias entre el mismo CM018 y los otros dos aislados (Tablas 4.9 y 13.4.5). No hay diferencias entre los aislados CA013 y CL039 (Tablas 4.9 y 13.4.5). Las divergencias entre los tres tests surgen en las comparaciones entre el control sano y los aislados CA013 y CL039: según LSD y Duncan, existen diferencias significativas en estas comparaciones, según Scheffé no las hay (Tablas 4.9 y 13.4.5).

Como acabamos de señalar, no hay diferencias entre tratamientos en lo referente a la longitud del tallo (Tabla 4.9).

Tabla 4.9.-Efecto del hongo inoculado sobre las longitudes de raíz principal y tallo de las plantas de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p>0,05) según los tests LSD, Duncan y Scheffé de comparación de medias para la variable "longitud de raíz" y el ANOVA F de Snedecor para la variable "longitud de tallo".

Inóculo	Longitud de raíz (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
P.irregulare	9,25 ± 0,39 b	8,75 ± 0,20 a
P.intermedium	11,18 ± 0,32 a	8,41 ± 0,12 a
P.paroecandrum	8,97 ± 0,33 b	8,33 ± 0,29 a
Control*	10,37 ± 0,12 a	8,21 ± 0,11 a

*Según Scheffé, el control no se diferencia de ninguno de los tres tratamientos.

4.3.4.3 Recuperación de patógeno

Los datos de recuperación del patógeno inoculado no se analizaron estadísticamente, pero se situaron en valores medios del 100% de recuperación en las plantas muertas y el 80% en las plantas supervivientes a las inoculaciones, para todos los tratamientos por igual. Coincidiendo con la lógica, no se aisló ningún hongo de las raíces de las plantas del control sano.

4.3.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE INÓCULO

4.3.5.1 Incidencia de enfermedad: Mortalidad

Con los datos de mortalidad acumulada en las cuatro semanas en las que se estudió la enfermedad, construimos las curvas de progreso de enfermedad de la Figura 4.9.

En el proceso seguido para el estudio estadístico de los datos de mortalidad repetimos lo apuntado en el ensayo anterior (apartado 4.3.4.1), es decir, comenzamos con el análisis para la variable "tiempo" constante y, en segundo lugar, calculamos la variable AUDPC estándar.

En el primero de los enfoques estudiamos la existencia de diferencias significativas ($p<0,05$) entre todos los tratamientos, incluyendo el control sano, mediante la prueba F de Snedecor, una vez comprobado que los datos cumplen las condiciones previas (consultar 3.2.6.2). El resultado de dicho análisis (Tabla 4.10) detecta diferencias para todos los tiempos considerados.

Tabla 4.10.-Valores del Análisis de varianza según la prueba F de Snedecor, aplicada a los datos de mortalidad acumulada para tres concentraciones de inóculo de los dos aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum*, incluyendo en el análisis los controles sin inóculo, sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Variable: mortalidad acumulada		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,9)	p
1	4,423987	0,023295
2	13,364042	0,000496
3	10,654708	0,001177
4	23,844204	0,000048

Pero asimismo, nos interesamos por la posible existencia de interacciones entre los dos factores estudiados "hongo inoculado" y "concentración de inóculo". Utilizamos también el análisis de varianza ANOVA F de Snedecor al mismo nivel de significación (5%), agrupando los datos en función de los dos factores y con exclusión del control sin inocular. Según esto, no se detectan interacciones entre los factores para ninguno de los tiempos (Tabla 4.11). Ninguno de los dos factores parecen tener efecto detectable en la mortalidad de las plántulas, con la salvedad del factor "hongo inoculado" en el tiempo 2 (segunda semana desde la inoculación) (Tabla 4.11).

Por su parte, en el estudio de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) tampoco se detectan interacciones entre los dos factores (Tablas 4.12 y 13.4.6), ni se detectan diferencias significativas ($p<0,05$) al comparar las tres concentraciones de inóculo (Tablas 4.12, 4.13 y 13.4.6). Por el contrario, sí hay diferencias al comparar los dos hongos inoculados como efecto principal (Tablas 4.12, 4.13 y 13.4.6).

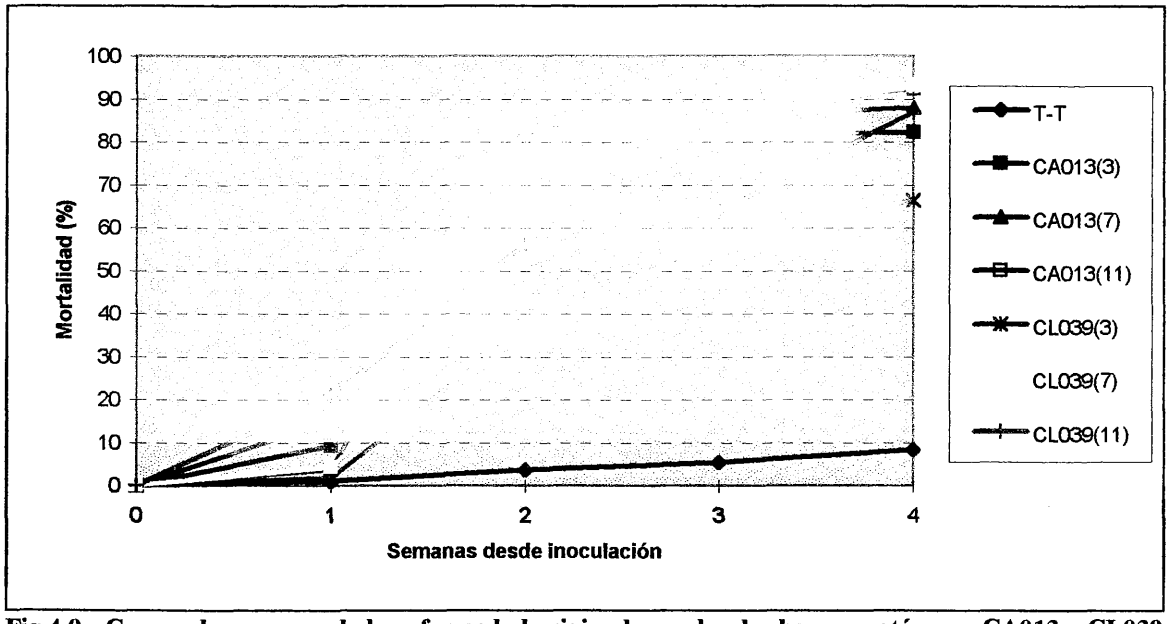


Fig.4.9.- Curvas de progreso de la enfermedad originada por los dos hongos patógenos CA013 y CL039 para tres concentraciones de inóculo.

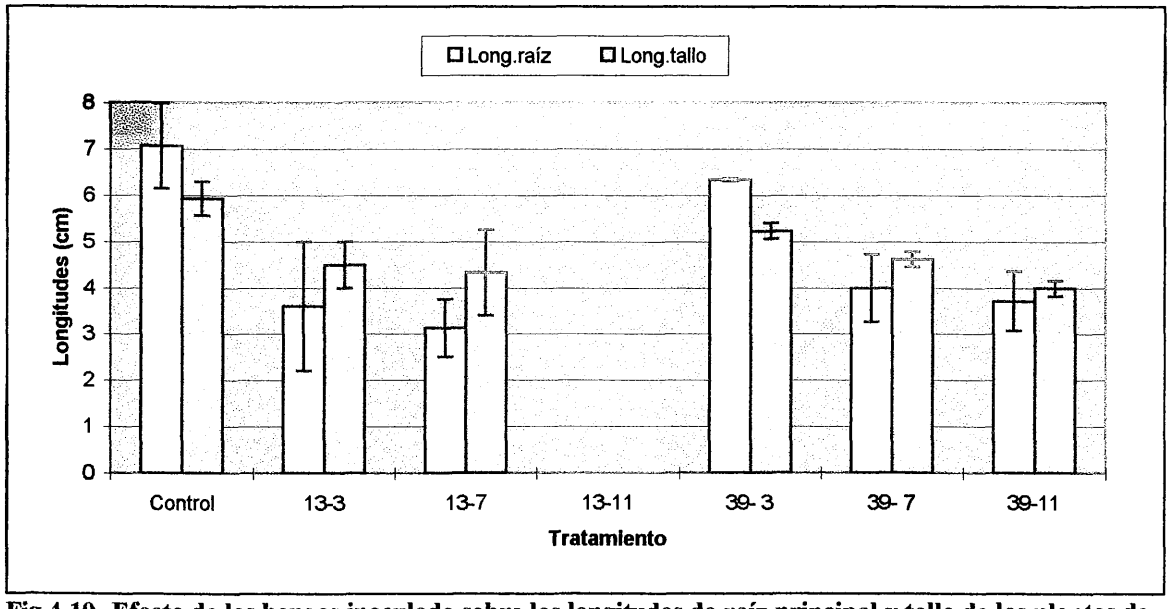


Fig.4.10.-Efecto de los hongos inoculado sobre las longitudes de raíz principal y tallo de las plantas de *C.arizonica* Greene para las res concentraciones de inóculo.

Tabla 4.11.-Efecto del hongo inoculado, de la concentración del inóculo y de la interacción entre ambos factores. Valores del estadístico según el test F de Snedecor, aplicado a los datos de mortalidad acumulada. Se excluyen del análisis los controles no inoculados con el hongo. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Factor: Concentración de inóculo		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(2,6)	p
1	1,307855	0,337738
2	0,502020	0,628648
3	0,542254	0,607469
4	2,007474	0,215034

Factor: Hongo inoculado		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(1,6)	p
1	0,440932	0,531346
2	12,099709	0,013167
3	1,822162	0,225754
4	0,380369	0,560063

Factor: Interacción		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(2,6)	p
1	5,166477	0,049575
2	0,161828	0,854179
3	0,384869	0,696206
4	0,791099	0,495528

Tabla 4.12.-Efecto del hongo, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente	
	AUDPCstd	
	F	p
Hongo	6,657379	0,041759*
Concentración	1,235303	0,355394
Interacción	0,358323	0,712847

Tabla 4.13.-Efecto del hongo inoculado y la concentración de inóculo sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: Hongo inoculado	AUDPCstd (%)
CA013	54,88± 2,66 a
CL039	41,27± 4,29 b

Factor: Concentración de inóculo	AUDPCstd (%)
Concentración-3	42,22± 7,01 a
Concentración-7	51,21± 3,97 a
Concentración-11	50,79± 5,30 a

Al introducir el control sano en la comparación con todos los tratamientos sí aparecen diferencias significativas al nivel de significación del 5% (Tabla 13.4.7). Los tests de comparación múltiple de medias, LSD, Duncan y Scheffé, coinciden en señalar diferencias significativas ($p<0,05$) entre el control sano y todos los demás tratamientos, exceptuando el tratamiento CL039-3 (plantas inoculadas con el aislado CL039 a la menor de las tres concentraciones ensayadas) según Scheffé (Tablas 4.14, 4.15 y 13.4.8).

Tabla 4.14.-Comparación de la variable AUDPC para las tres concentraciones de inóculo ensayadas. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p< 0,05) según LSD.

Inóculo	AUDPCstd (%.semana)		
	P.irregulare	*P.paroecandrum*	Control
Concentración-3	52,09± 9,09 a	32,35± 4,29 b	
Concentración-7	57,13± 3,25 a	45,28± 3,72 ab	3,59± 0,73 c
Concentración-11	55,41± 0,84 a	46,18± 11,21 ab	

Tabla 4.15.-Comparación de la variable AUDPC para las tres concentraciones de inóculo ensayadas. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según Duncan o Scheffé (letras entre paréntesis).

Inóculo	AUDPCstd (%)		
	P.irregulare	*P.paroecandrum*	Control
Concentración-3	52,09± 9,09 a (a)	32,35± 4,29 a (ab)	
Concentración-7	57,13± 3,25 a (a)	45,28± 3,72 a (a)	3,59± 0,73 b (b)
Concentración-11	55,41± 0,84 a (a)	46,18± 11,21 a (a)	

4.3.5.2 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes y pesos frescos

Los valores medios de las variables "longitud de raíz principal" y "longitud de tallo" se recogen en la Figura 4.10. Las medias de las variables "peso fresco de raíz" y "peso fresco de parte aérea" se detallan en la Figura 4.11. En este punto hay que indicar que no se pudieron tomar datos de los parámetros de crecimiento del tratamiento CA013-11 porque las escasas plántulas supervivientes a las cuatro semanas que duró el ensayo eran tan pequeñas y estaban tan dañadas que no pudieron manipularse.

El estudio de las interacciones mediante la prueba F de Snedecor aplicada a las cuatro variables consideradas solo detecta interacciones en las variables "longitud de tallo" y "peso

fresco de raíz" (Tablas 4.16 y 4.17). Existen diferencias significativas entre los dos hongos para todas las variables (Tablas 4.16 y 4.17). También existen diferencias en la comparación de las tres concentraciones de inóculo para todas las variables, excepto cuando se analiza el peso fresco de raíz, aunque la probabilidad "p" exhibe un valor próximo al 5% (p= 0,0835) (Tablas 4.16 y 4.17).

Tabla 4.16.-Efecto del hongo, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Hongo	16,227289	0,006893*	21,028719	0,003748*
Concentración	8,822753	0,016338*	24,401106	0,001313*
Interacción	1,888763	0,231083	10,283728	0,011519*

Tabla 4.17.-Efecto del hongo, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de sistema radicular y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	9,562432	0,021325*	28,159676	0,001818*
Concentración	3,862189	0,083556	10,115023	0,011969*
Interacción	5,464658	0,044519*	3,711066	0,089328

Concretando, la existencia de interacciones entre los factores "hongo inoculado" y "concentración de inóculo" para la variable "longitud de tallo" nos induce a estudiar todos los tratamientos en su conjunto. Existen diferencias significativas al nivel de significación del 5% según el ANOVA F para el conjunto de todos los tratamientos (Tabla 13.4.10). Según LSD el control sano es distinto de todos los demás tratamientos exceptuando el CL039-3, que es el que presenta una longitud de tallo mayor (Tablas 4.18 y 13.4.11). Para los otros dos tests no hay diferencias entre los tratamientos y el control sano (Tablas 4.18 y 13.4.11). El tratamiento CA013-11 es distinto de todos los demás tratamientos según las tres pruebas de comparación de medias, pero hay que recordar que no fue posible recoger datos de este tratamiento por lo que se le asignó el valor "0" a la hora de realizar el análisis estadístico (Tablas 4.18 y 13.4.11). No hay diferencias entre el resto de los tratamientos para ninguno de los tests (Tablas 4.18 y 13.4.11).

Al no existir interacciones la longitud de raíz puede estudiarse agrupando los datos en función de los dos factores "hongo inoculado" y "concentración de inóculo". Los tres tests de comparación de medias coinciden en señalar las diferencias entre ambos hongos (Tablas 4.19 y 13.4.12). Según los mismos tests las concentraciones 3 y 11 son significativamente distintas (p<0,05) (Tablas 4.19 y 13.4.12); la concentración-7 no se diferencia de ninguna de las otras dos (Tablas 4.19 y 13.4.12). Según esto, parece que la concentración más elevada ha producido una mayor reducción en la longitud de la raíz principal. Asimismo, el aislado CA013 ha reducido significativamente dicha variable frente a los valores registrados por las

plantas inoculadas con CL039. La comparación de todos los tratamientos con el control sano (Tabla 13.4.10) detecta diferencias significativas ($p<0,05$). Según LSD el único tratamiento que no se distingue del control es el CL039-3 (Tabla 13.4.13). Por su parte, Duncan y Scheffé coinciden en que el único tratamiento distinto del control es el CA013-11 (Tabla 13.4.13), pero esto se debe a que se le asignó el valor "0" para poder realizar el análisis.

Tabla 4.18.-Comparación de la variable "longitud de tallo" para tres concentraciones de inóculo de los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum* sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según LSD, según Duncan y Scheffé (letras entre paréntesis "()").

	Longitud de tallo (cm)	
Tratamiento	P.irregulare (CA013)	P.paroecandrum (CL039)
Control	5,93 ± 0.53 a (a)	
Conc3	4,50 ± 0.50 b (a)	5,23 ± 0.17 ab (a)
Conc7	4,32 ± 0.93 b (a)	4,61 ± 0.16 b (a)
Conc11	----------	3,99 ± 0.17 b (a)

Control = plantas sanas (sin inocular); Conc3 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 3.10^4 esp/ml.; Conc7 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 7.10^4 esp/ml.; Conc11 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 11.10^4 esp/ml.

Tabla 4.19.-Efecto del hongo inoculado y de la concentración de inóculo sobre la longitud de raíz principal. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD, Duncan y Scheffé.

Factor: Hongo inoculado	Longitud de raíz (cm.)
CA013	2,24± 0,82 b
CL039	4,68± 0,58 a

Factor: Concentración de inóculo	Longitud de raíz (cm.)
Concentración-3	4,97± 0,98 a
Concentración-7	3,56± 0,47 ab
Concentración-11	1,86± 1,10 b

La variable "peso fresco de parte aérea" tampoco presenta interacción entre los factores (Tabla 4.17). Resultados similares se obtienen al evaluar estadísticamente esta variable: el aislado CA013 registra pesos frescos de parte aérea significativamente ($p<0,05$) menores que las de CL039 (Tabla 4.20) y, además, la concentración-11 es la que registra el menor valor de la variable, significativamente distinto de las otras dos concentraciones, que se igualan entre si (Tablas 4.20 y 13.4.16). Hay diferencias significativas cuando se analizan todos los tratamientos mediante ANOVA F (Tabla 13.4.15). El control sano se diferencia significativamente ($p<0,05$) solo de CA013-11 según Duncan (Tabla 13.4.17) y se diferencia de CA013-3 y CA013-11 según Scheffé (Tabla 13.4.17). Para LSD el control se equipara a los tratamientos CL039-3 y CL039-7 (Tabla 13.4.17)[2].

Tabla 4.20.-Efecto del hongo inoculado y de la concentración de inóculo sobre la variable "peso fresco de parte aérea". Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD, Duncan y Scheffé.

Factor: Hongo inoculado	Peso fresco de parte aérea (g)
CA013	0,0215± 0,0080 b
CL039	0,0483± 0,0047 a

Factor: Concentración de inóculo	Peso fresco de parte aérea (g)
Concentración-3	0,0419± 0,0117 a
Concentración-7	0,0438± 0,0026 a
Concentración-11	0,0189± 0,0111 b

La variable "peso fresco de sistema radicular" también se analiza por el ANOVA F de Snedecor aplicado a todos los tratamientos en conjunto, debido a la existencia de interacciones entre los dos factores (Tabla 4.17). Al comparar todos los tratamientos, incluido el control sano, no se detectan diferencias significativas al nivel de significación del 5% (Tablas 4.21 y 13.4.15). Según la misma prueba F no existen diferencias entre las concentraciones aunque sí existen entre los dos hongos inoculados (Tablas 4.17 y 4.21).

[2] Recordemos el valor "0" asignado al tratamiento CA013-11.

Tabla 4.21.-Comparación de la variable "peso fresco de sistema radicular" para tres concentraciones de inóculo de los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum* sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según F de Snedecor.

	Peso fresco de raíz (g)	
Tratamiento	P.irregulare (CA013)	P.paroecandrum (CL039)
Control	0,0218 ± 0,0112 a	
Conc3	0,0054 ± 0,0004 a	0,0315 ± 0,0024 a
Conc7	0,0201 ± 0,0038 a	0,0155 ± 0,0103 a
Conc11	----------	0,0138 ± 0,0023 a

Control = plantas sanas (sin inocular); Conc3 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 3.10^4 esp/ml.; Conc7 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 7.10^4 esp/ml.; Conc11 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 11.10^4 esp/ml.

4.3.5.3 Síntomas: daños aparentes en raíz

Los síntomas aparentes en la raíz, básicamente necrosis o pudriciones, basados en una escala de 0 a 5, se recogen en la Figura 4.12 y se estudian estadísticamente mediante el ANOVA F de Snedecor. No se detecta interacción entre los factores "hongo inoculado" y "concentración de inóculo" (Tabla 4.22) y tampoco se detectan diferencias significativas para el efecto de las concentraciones (Tablas 4.22 y 4.23). Tampoco puede considerarse diferente el comportamiento de ambos hongos, puesto que la probabilidad "p" de la prueba F se encuentra en el límite de significación (p= 0,0491) (Tablas 4.22 y 4.23). La inclusión del control sano y de todos los tratamientos en el análisis ANOVA F señala, lógicamente, claras diferencias significativas (Tabla 13.4.19). Los daños menores entre los tratamientos inoculados los registra el tratamiento CL039-3, a un nivel muy cercano a las plantas sanas (Tabla 4.24). Los daños mayores se han producido en el tratamiento CA013-11 (Tabla 4.24).

Tabla 4.22.-Efecto del hongo, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre el nivel de daños producidos por los patógenos en plántulas de *Cupressus arizonica* Greene. Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente	
	Daños	
	F	p
Hongo	6,050391	0,049136*
Concentración	3,067094	0,120899
Interacción	2,747410	0,142216

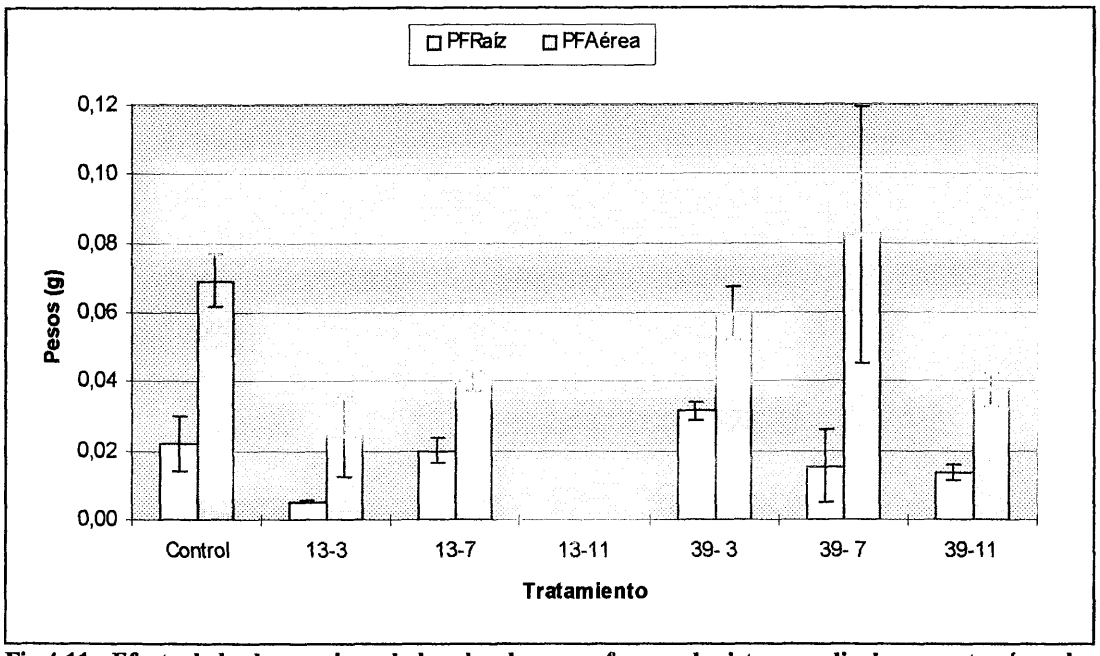


Fig.4.11.- Efecto de los hongos inoculado sobre los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de plántulas de *C.arizonica* Greene para tres concentraciones de inóculo.

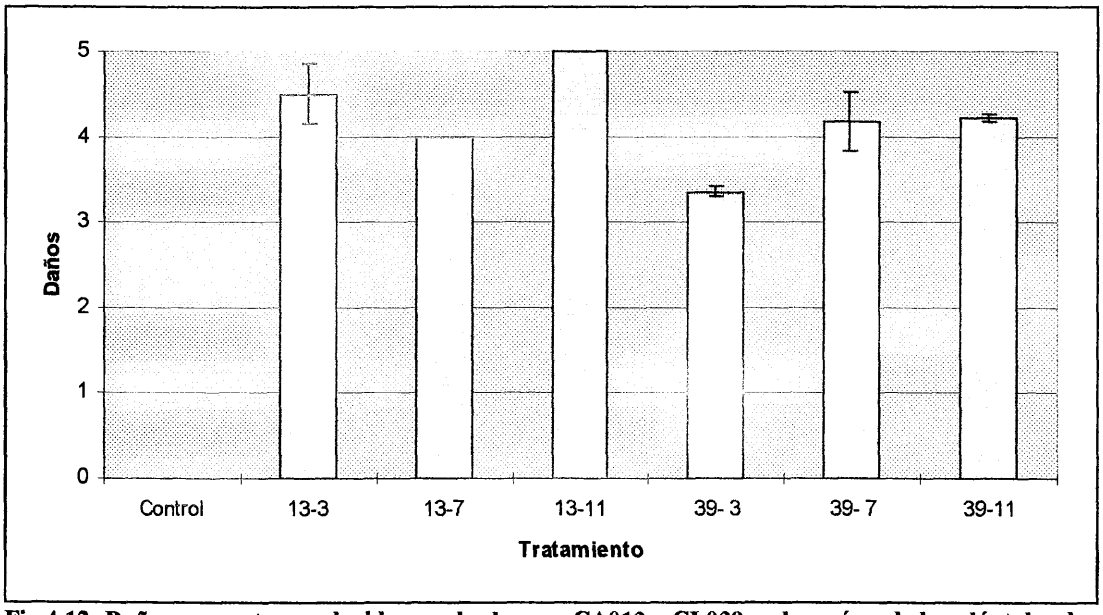


Fig 4.12.-Daños aparentes producidos por los hongos CA013 y CL039 en las raíces de las plántulas de *C.arizonica* Greene para tres concentraciones de inóculo.

Tabla 4.23.-Efecto del hongo inoculado y de la concentración de inóculo sobre la variable "nivel de daños". Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: Hongo inoculado	Daños
CA013	4,5 ± 0,2 a
CL039	3,9 ± 0,2 a*

Factor: Concentración de inóculo	Daños
Concentración-3	3,9 ± 0,4 a
Concentración-7	4,1 ± 0,2 a
Concentración-11	4,6 ± 0,2 a

*La probabilidad se sitúa justo al límite fijado (p= 0,049).

Tabla 4.24.-Comparación de los valores medios de los daños para tres concentraciones de inóculo de los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum* sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según el test LSD y según Duncan y Scheffé (letras entre paréntesis).

	Daños	
Tratamiento	P.irregulare (CA013)	P.paroecandrum (CL039)
Control	0,0 ± 0,0 d (c)	
Conc3	4,5 ± 0,5 ab (ab)	3,4 ± 0,1 c (b)
Conc7	4,0 ± 0,0 bc (ab)	4,2 ± 0,5 b (ab)
Conc11	5,0 ± 0,0 a (a)	4,2 ± 0,1 b (ab)

Control = plantas sanas (sin inocular); Conc3 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 3.10^4 esp/ml.; Conc7 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 7.10^4 esp/ml.; Conc11 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 11.10^4 esp/ml.

4.3.5.4 Recuperación de patógeno

De las plantas examinadas se obtuvieron porcentajes de recuperación del patógeno inoculado en torno al 100% en las plantas muertas y al 80% en las plantas supervivientes a las inoculaciones.

4.4 DISCUSIÓN

Parece clara la importancia, durante el período considerado (de finales de 1991 a principios de 1995), de los hongos del género *Pythium* como productores de enfermedad en las fases de producción en vivero de planta ornamental en la Comunidad de Madrid, con claro predominio frente a otros géneros de hongos del suelo. Sin embargo, el estudio realizado es insuficiente para llevar a cabo una cuantificación sobre la distribución de las enfermedades de suelo en planta ornamental en la región, puesto que, dadas las peculiaridades del cultivo de ornamentales en vivero comercial, nuestro trabajo no se ha basado en una recogida de muestras sistemática sobre las mismas plantas a lo largo del tiempo. Solo en el caso de uno de los viveros, el vivero Puerta de Hierro (Madrid), tuvimos la oportunidad de recoger muestras de plantas enfermas de los géneros más afectados, *Cupressus* y *Pyracantha*, en grandes cantidades (más de 30 plantas de cada lote) y en cada uno de los 3,5 años que duró la experiencia.

Como comparación nos sirve un estudio realizado en viveros de plantas forestales en Francia (*Pinus, Abies, Larix*, etc.) donde las especies de *Pythium* constituyeron solo un 20% de los aislamientos realizados por los autores, con una mayoría de *Fusarium oxysporum* y de *Rhizoctonia solani* (PERRIN Y SAMPANGI,1986). Nosotros esperábamos obtener unos resultados semejantes en nuestra zona, especialmente si tenemos en cuenta la obra de TUSET E HINAREJOS (1995) en donde no se menciona a *Pythium* como patógeno importante de *Cupressus* en España.

Por otro lado, la influencia de las condiciones ambientales es tal que puede modificar el predominio que, durante el período de estudio considerado, parecían ostentar los hongos de la familia *Pythiaceae* como principales productores de enfermedad en los viveros de planta ornamental de la Comunidad de Madrid, razón por la cual las conclusiones presentadas aquí no serían, en principio, extrapolables a otras condiciones.

Las tres especies más frecuentemente aisladas han sido: *P. irregulare* (32%), *P.paroecandrum* (21%) y *P. intermedium* (13%). Además, estas especies pueden afectar a un gran número de huéspedes diferentes, por lo que el riesgo de propagación de la enfermedad es muy alto. A partir de estos resultados se deduce el interés por profundizar en el conocimiento de estos patógenos y los métodos para combatir estas enfermedades.

En las pruebas de patogenicidad las tres especies de *Pythium* estudiadas se han mostrado como altamente virulentas, muy agresivas, matando un porcentaje muy elevado de las plantas en semillero, entre un 80 y un 90%, en las primeras semanas desde la nascencia. Nuestros resultados confirman los obtenidos por otros autores que califican a *Pythium irregulare* como muy virulento (HENDRIX Y CAMPBELL,1968). Las plantas de *Cupressus* inoculadas artificialmente en post-emergencia rápidamente mostraron síntomas de "damping-off", con muerte de gran número de plántulas en un corto espacio de tiempo desde la inoculación, concretamente en la primera semana desde la inoculación (de 5 a 7 días) se producen del 0 al 5% de las muertes, según especies y aislados.

Hemos encontrado alguna referencia bibliográfica a la comparación de la virulencia de varias especies de *Pythium* y *Phytophthora*. En un trabajo de VAARTAJA (1975) la patogenicidad de *Pythium sylvaticum* Campbell & Hendrix fue similar a la de otros cuatro hongos (*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick, *Phytophthora cactorum* (Leb.&Cohn)Schroet, *Pythium ultimum* Trow y *Rhizoctonia solani* Kuehn). Nosotros no hemos encontrado apenas diferencias en patogenicidad o virulencia entre las tres especies de *Pythium* estudiadas en este trabajo, aunque otras referencias hablan de grandes diferencias en patogenicidad entre varias especies del género (DARVAS Y COL.,1978). *Phytophthora cactorum* sí presentó una virulencia algo inferior a las especies de *Pythium*, aunque este hecho no ha sido contrastado repitiendo inoculaciones.

Según el ensayo de comparación de la evolución de la enfermedad producida por los tres aislados CA013, CM018 y CL039 de las tres especies de *Pythium* más frecuentemente detectadas, los tres se comportan de forma semejante, aunque el aislado de la especie *P.intermedium* aparece como algo menos virulento que los otros dos, y esto se aprecia tanto en la mortalidad producida como en los efectos sobre el crecimiento en longitud de la raíz principal. No hay consecuencias sobre el crecimiento del tallo. Este hecho podría relacionarse con una cierta desventaja asociada al tipo de inóculo inicial ("cuerpos reproductores" en lugar de oosporas), aunque no podemos afirmarlo porque las ligeras diferencias no son estadísticamente significativas.

Del ensayo de tres concentraciones de inóculo podemos extraer las conclusiones que se exponen a continuación. Las concentraciones menores (3.10^4 y 7.10^4 esporas/ml) producen unos niveles de enfermedad similares, medidos como mortalidad, daños en raíz y efectos sobre el crecimiento. La concentración más elevada (11.10^4 esporas/ml) produce efectos más acusados en algunos parámetros de crecimiento (en longitud de raíz principal, por ejemplo), aunque no parece que afecte a la mortalidad. Sobre el crecimiento del tallo, medido tanto en longitud como en peso fresco, no hay diferencias entre las tres concentraciones ensayadas. Tampoco hay diferencias en la comparación de las tres concentraciones con el control sano en cuanto a pesos frescos. La longitud del tallo parece verse ligeramente reducida por efecto de los hongos respecto al control sano, pero este efecto solo se detecta con el test menos exigente (LSD). Con la longitud de raíz sucede lo mismo. Parece haber un mayor efecto de la concentración más elevada sobre la reducción de la longitud de raíz.

En contraste con nuestros resultados, numerosos estudios se refieren a la influencia de la densidad de inóculo sobre la patogenicidad y/o virulencia de *Pythium* (LAZAROVITS,1985). En ambiente controlado, LAZAROVITS (1985) encontró una relación directamente proporcional entre la densidad del inóculo de *Phytophthora megasperma* y la caída de plántulas de soja. BHATTI Y KRAFT (1992) relacionan un incremento en la gravedad de la enfermedad producida por varios patógenos de suelo (entre ellos *P.ultimum*) sobre garbanzo al incrementar la densidad de inóculo (de 0 a 5.000 cfu/g.ss). Según otro estudio, cuando se aumentó la densidad de inóculo de 0,5 a 5 y 50 clamidosporas de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* por gramo de suelo, la tasa de infección aparente "r" creció progresivamente en la cámara de cultivo pero no ocurrió lo mismo en el invernadero. Se observó que la mortalidad de plantas se producía antes con las concentraciones de inóculo mayores (KANNWISCHER Y MITCHELL,1978).

Nuestros resultados se asemejan más a los obtenidos por RISTAINO (1991) que encontró que la incidencia final de la enfermedad fue independiente de la densidad del inóculo de *Phytophthora cactorum* sobre pimiento en campos de cultivo de Carolina del Norte. El autor deduce que se trata de una enfermedad policíclica.

Por otra parte, el aislado CA013 de *P.irregulare* aparece como ligeramente más virulento que el CL039, en las mismas condiciones ambientales, lo que podría deberse a que la temperatura óptima de patogenicidad del segundo es más elevada que la de *P.irregulare* (VAN DER PLAATS-NITERINK, 1981). No hay diferencias entre las tres concentraciones ni entre los dos hongos en cuanto a los daños en raíz producidos sobre las plantas supervivientes a las cuatro primeras semanas de la enfermedad.

5. INFLUENCIA DEL MOMENTO DE INOCULACIÓN CON RELACIÓN A LA EDAD DEL HUÉSPED.

5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

5.1.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

La enfermedad producida por aislados de las especies fitopatógenas *Pythium irregulare* Buisman y *Pythium paroecandrum* Drechsler sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene se manifiesta con síntomas claros de "damping-off", con necrosis y estrangulamientos en raíz y cuello y una elevada mortalidad.

A través de inoculaciones artificiales en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo pretendíamos comprobar la influencia que tiene la presencia de los aislados CA013 de *Pythium irregulare* y CL039 de *Pythium paroecandrum* sobre el normal desarrollo de las plántulas de *Cupressus arizonica* en semillero, para dos momentos de inoculación: en la segunda semana después de la emergencia (inoculación-1) y en la sexta semana desde la emergencia (inoculación-2). Dichos efectos se han medido mediante dos parámetros:

1°.- **Incidencia de la enfermedad,** a partir del porcentaje acumulado de plantas muertas por el patógeno a lo largo del tiempo, con lo que construimos las curvas de progreso de la enfermedad.

2°.- **Efectos sobre el crecimiento** de las plantas, registrando las longitudes de raíz principal y tallo y los pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes al tratamiento infectivo.

El ensayo se repitió dos veces. Los aislados seleccionados para estos ensayos lo fueron por ser los que presentaron mayores indicadores de virulencia en pruebas de patogenicidad previas y mejor comportamiento para su cultivo en medio sintético.

5.1.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO

Los ensayos de campo son siempre recomendables para comprobar la validez de los resultados obtenidos en condiciones controladas o para adaptar las conclusiones obtenidas en los otros ensayos a la realidad de unas condiciones ambientales reales que son, inevitablemente, cambiantes.

Los ensayos en umbráculo se realizaron durante los años 1993, 1994 y 1995. El objeto de estos ensayos fue el estudio de la influencia de la inoculación con los aislados CA013 de *Pythium irregulare* y CM018 de *P. intermedium* sobre el cultivo en nascencia y vivero en condiciones reales. En concreto, se evalúa el efecto de las inoculaciones artificiales con dos inóculos sobre el crecimiento de plantas en las fases de semillero, transplante, primer y segundo año de cultivo de *Cupressus arizonica Greene* para seis momentos de inoculación según edad de la planta.

Sabemos, gracias a los ensayos de patogenicidad previos, realizados en condiciones controladas, que el principal efecto de estos hongos sobre las plántulas de *Cupressus*, en la fase de semillero, es provocar la muerte del huésped. Con este ensayo pretendemos contrastar dichos resultados con los de campo, en condiciones reales de cultivo en vivero comercial y, asimismo, estudiar el posible efecto posterior sobre el crecimiento del cultivo hasta su comercialización (uno o dos años desde la siembra).

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 MATERIALES

5.2.1.1 Ensayos en condiciones controladas

Para los ensayos en condiciones controladas se utilizó el mismo sustrato mezcla descrito en el epígrafe 3.1.1.1 donde se sembraron semillas de *Cupressus arizonica* Greene como se expone en los epígrafes 3.1.2 y 3.2.4.1.

Para estos ensayos se utilizaron los aislados CA013 de *Pythium irregulare* Buisman y CL039 de *Pythium paroecandrum* Drechsler, cuya procedencia quedó expuesta en el epígrafe 3.1.4. Se eligieron estos aislados por corresponder a las dos especies de *Pythium* más detectadas como causantes de daños en las plantas ornamentales estudiadas y por su buen comportamiento para la preparación de los inóculos a partir de cultivos de los hongos en medio sintético.

Tanto los medios de cultivo, la preparación de los inóculos CA013 y CL039 como la inoculación siguen en todo el procedimiento relatado antes en 3.2.4. La recuperación del hongo inoculado a partir de las raíces de las plantas supervivientes al final de los ensayos se hicieron siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.3. Las identificaciones se realizan a partir de cultivos de los hongos en medio LBA por el procedimiento referido en 3.1.3.2 y 3.2.1.

5.2.1.2 Ensayos de campo en umbráculo

Para el semillero se utilizaron las mezclas de sustratos descritos en 3.1.1.2 adecuadas, una para el semillero, y la otra para el transplante. Utilizamos el mismo tipo de semilla de *Cupressus arizonica* Greene citada en 3.1.2.

Se inocularon las plantas con los aislados de los hongos patógenos del género *Pythium* de las especies *Pythium irregulare* Buisman (CA013) y *Pythium intermedium* de Bary (CM018). La procedencia de los dos aislados se detalla en 3.1.4.

Para estos ensayos de campo se escogió el aislado CA013 de la especie *P.irregulare* por ser la especie más frecuentemente detectada y el aislado CM018 de *P.intermedium* porque, teniendo en cuenta que, en general, los aislados ensayados en cámara de cultivo habían ofrecido la misma respuesta ante los tratamientos con independencia del hongo

inoculado y, dadas sus características morfológicas (producción de hinchamientos hifales) y fisiológicas (heterotalismo, baja producción de esporas en cultivo) muy distintas a las del primero, cabría esperar mayor diferencia de comportamiento que lo mostrado por el aislado de *P.paroecandrum* utilizado en los ensayos en condiciones controladas. Por otro lado, carecíamos de medios materiales y humanos suficientes para trabajar con más de dos inóculos

Los reaislamientos a partir de las raíces de plantas conservadas en condiciones de frío (3-4°C) que sirven de base para la producción del inóculo, y los aislamientos del hongo inoculado a partir de las raíces de las plantas supervivientes a los tratamientos se realizan con el medio P_5ARP modificado (ver 3.1.3.2 y 3.1.3.6).

Los inóculos se prepararon con el medio Agar-V8 (ver 3.1.3.5) y para la identificación posterior a su aislamiento se cultivaron en medio LBA.

5.2.2 MÉTODOS

5.2.2.1 Ensayos en condiciones controladas

5.2.2.1.1 Siembra y preparación de inóculo

Los métodos de siembra en bandejas de alvéolos, preparación de los inóculos y método de inoculación se ajustan a lo expuesto en los métodos generales para los ensayos en condiciones controladas (apdo. 3.2.4).

Para el primer ensayo, la concentración de la suspensión de esporas resultante fue:

Para CA013: $6{,}4\times10^4$ esporas/ml. para la 1ª inoculación y de $6{,}8\times10^4$ para la segunda;
Para CL039: $7{,}5\times10^4$ esporas/ml para la primera inoculación y $4{,}2\times10^4$ para la segunda.

En el segundo ensayo la concentración resultante para ambos inóculos se ajustó a $6{,}4\times10^4$ en ambas inoculaciones.

En los dos ensayos las estructuras fúngicas predominantes fueron oosporas.

5.2.2.1.2 Momento de inoculación

El momento de la inoculación se escogió en función de la edad de las plántulas y se fijó en la segunda y la sexta semana desde la emergencia (inoculación-1 e inoculación-2 respectivamente), lo que se corresponde, en general, con la cuarta y octava semana desde la siembra (1 y 2 meses desde la siembra).

Se regó el sustrato con la suspensión de esporas antes indicada a razón de 5 ml. por alvéolo, de modo que las concentraciones de inóculo quedaron así:

Primer ensayo

Para CA013: 700 cfu ó propágulos/gramo de suelo seco (cfu/g.ss) para la inoculación-1 y de 800 cfu/g.ss para la inoculación-2 ; y

Para CL039: 900 cfu/g.ss para la inoculación-1 y 500 cfu/g.ss para la inoculación-2.

Segundo ensayo

Para los dos inóculos en ambas inoculaciones la concentración final de inóculo fue de 700 cfu/g.ss.

5.2.2.1.3 Condiciones ambientales

Durante el primer ensayo las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo sometidas a una temperatura noche/día, para el aislado CA013, de 15,5±0,5/22,0±1,0 ºCelsius durante las seis primeras semanas (con una subida puntual a 26ºC) y 20/24,5±1,5 durante las últimas dos. En el caso de CL039, las temperaturas de la cámara de cultivo se mantuvieron a 17,0±1,0/22,0±2,0 ºCelsius durante las primeras cinco semanas y a 20,5±0,5/24±1,0 ºC durante las últimas tres (Tabla 5.1). Las condiciones de humedad y fotoperíodo se corresponden exactamente con las referidas en 3.2.4.4.

En el segundo ensayo las temperaturas noche/día en la cámara se mantienen durante todo el ensayo en unos valores medios de 17,0±2,1 /25,5±2,4 ºCelsius. La humedad relativa del aire ronda el valor medio de 87,2±6,6 por ciento. La Tabla 5.2 recoge solo los valores tomados semanalmente en el momento de la toma de datos.

Tabla 5.1.-Datos de temperaturas máximas y mínimas registradas en la cámara de cultivo en los ensayos realizados con los dos aislados patógenos *P.irregulare* y *P.paroecandrum*. Primer ensayo.

	P.irregulare (CA013)		*P.paroecandrum* (CL039)	
ddi	Tmin.	Tmax.	Tmin.	Tmax.
0	15	21	16	20
7	**16**	22	16	20
14	**15**	22	17	22
21	**15**	22	17	24
28	**15**	22	18	24
35	**15**	26	20	23
42	**20**	23	21	24
49	20	23	21	25

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo (Temperaturas en ºCelsius)

	CA013	CL039
Temperatura media de las maximas:	22,7±1,6	23,1±1,7
Temperatura media de las minimas:	16,6±2,4	18,6±2,1
Humedad Relativa (%):	85,0±5,2	

Tabla 5.2.-Datos de temperaturas máximas y mínimas, humedad relativa del aire y temperatura del sustrato (Tsust) en relación a la temperatura del aire (Taire) registradas a las 9 horas en la cámara de cultivo en los ensayos realizados con los dos aislados patógenos *P.irregulare* y *P.paroecandrum*. Segundo ensayo.

Ddi	Tmin.(ºC)	Tmax (ºC).	HR (%).	Taire (9h)	Tsust.(9h)
0	14,5	22,5	88	20	21
7	18	24	86	23	20
14	18	23	--	22	19
21	18	23	85	21,5	19
28	17	24	81	24	20.5
35	18	22	82	22	19
42	18	22	80	22	21
49	18	23	85	22	20

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en ºCelsius)

Temperatura media de las maximas:	25,5±2,4
Temperatura media de las minimas:	17,0±2,1
Humedad Relativa:	87,2±6,6

5.2.2.1.4 Parámetros evaluados

Los detalles sobre la obtención de los datos registrados durante estos ensayos se recogen en el apartado 3.2.5.6.

Se tomaron datos cada semana durante las siete que duró cada ensayo. Por un lado, se calculó el porcentaje de plantas afectadas por la enfermedad (porcentaje de mortalidad) parámetro que estima la incidencia de la enfermedad.

Por otro lado, al finalizar cada ensayo, al cabo de 6 semanas desde la inoculación, se midieron las longitudes de tallo y sistema radicular de las plantas supervivientes. Además se procesaron en laboratorio para determinar la frecuencia de recuperación del patógeno inoculado.

En el segundo ensayo, además de los anteriores, también se registraron los valores de pesos frescos y secos, tanto de la parte aérea como del sistema radicular.

5.2.2.1.5 Diseño y métodos estadísticos

Se escogió un diseño completamente aleatorio de dos factores: hongo inoculado y momento de inoculación, con tres repeticiones por tratamiento, dos tratamientos para cada inóculo y dos controles:

Plantas inoculadas en la segunda semana desde la emergencia = inoculación-1
Plantas inoculadas en la sexta semana desde la emergencia = inoculación-2
Control1: plantas sin inóculo (control sano) en el momento de desarrollo de las plantas del tratamiento "inoculación-1".
Control2: plantas sin inóculo (control sano) en el momento de desarrollo de las plantas del tratamiento "inoculación-2".

Este primer ensayo se realizó en dos momentos sucesivos empleando cada vez uno de los dos hongos, con un número medio de plantas por repetición de 31 para CA013 y 35 para CL039.

El ensayo se repitió una segunda vez con las mismas características, en este caso ensayando ambos aislados al mismo tiempo y con un total de seis repeticiones por tratamiento. El número de plantas por repetición se limitó a un máximo de 40.

Los procedimientos estadísticos empleados para el estudio de los datos de mortalidad semanal, curvas de progreso de enfermedad, recuperación del patógeno inoculado y parámetros de crecimiento (longitudes y pesos de raíz y parte aérea) son los fijados previamente en el epígrafe de materiales y métodos generales (epígrafe 3.2.6).

Las curvas de progreso de enfermedad para el primer ensayo se evaluaron en su ajuste a los cuatro modelos no lineales linealizables: Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz (CAMPBELL Y MADDEN, 1990) citados anteriormente en 3.2.6.5.2.

Una vez encontrado el modelo al que se ajustaban mejor todas las curvas se procedió a la comparación entre los tratamientos mediante la comparación de los parámetros del modelo por el método de los intervalos de confianza (consultar 3.2.6.5.1). Las mismas comparaciones se realizaron calculando el área bajo la curva de progreso de enfermedad (AUDPC) para cada una de las curvas.

El ajuste de las curvas de progreso de enfermedad a los modelos linealizables solo se realizó con los datos del primer ensayo, ya que en él comprobamos que el resultado obtenido era concordante con la comparación entre epidemias realizada a partir del cálculo del área bajo la curva (AUDPC), método éste más sencillo y rápido y suficientemente apropiado para el tipo de estudio que pretendíamos realizar con estos trabajos.

5.2.2.2 Ensayos de campo en umbráculo

5.2.2.2.1 Siembra

Para las inoculaciones en primer año de cultivo (inoculaciones 1, 2 y 3) la siembra se realizó el 29 de abril de 1994, en bandejas, por el método explicado en 3.2.5.1 (procedimiento A). Se disponen tres repeticiones por tratamiento. La emergencia tuvo lugar alrededor del 20 de mayo, aproximadamente a los 21 días (3 semanas) de la siembra.

Las plantas que van a ser inoculadas en el segundo año se siembran a voleo el 11 de mayo de 1993, en era, siguiendo el procedimiento B descrito en 3.2.5.1. La emergencia se produjo alrededor del 7 de junio, a los 26-27 días de la siembra.

5.2.2.2.2 Transplante

Para las inoculaciones en el primer año de cultivo, de cada bandeja del semillero se transplantan 35 plantas a maceta de plástico, según el método expuesto en 3.2.5.2. Se agrupan por bloques en el umbráculo. Los bloques se distribuyen al azar dentro del umbráculo, con un total de tres bloques por tratamiento. De esta manera se transplantan tres bloques de 35 plantas cada uno para cada uno de los tratamientos, además de los testigos sin inocular. Esta operación se realizó entre los días 14 y 17 de noviembre de 1994.

Para las inoculaciones en segundo año se opera de la misma forma con la única diferencia de que se transplantan 30 plantas en cada bloque. La fecha de transplante es el 18 al 21 de noviembre de 1993.

5.2.2.2.3 Preparación de inóculo y momentos de inoculación

5.2.2.2.3.1 Primera inoculación (Inoculación-1).

Se llevó a cabo el 1 de junio de 1994, en la segunda semana desde la emergencia, es decir, con plantitas de 5 semanas de edad desde la siembra.

El inóculo se preparó de la forma descrita en 3.2.5.3. Las concentraciones finales de esporas en las suspensiones que se obtuvieron, medidas con hematocitómetro Bürker, fueron las siguientes:

Para CA013: $6{,}4.10^4$ esporas/ml (lleva algo de micelio pero muy poco en comparación con la cantidad de esporas, mayoritariamente oosporas).

Para CM018: $3{,}13.10^4$ esp/ml (mayor cantidad de micelio que el otro aislado, las esporas son estructuras reproductoras o hinchamientos hifales ("hyphal swellings").

Como ya se indicó en 3.2.5.4 se aplicó una dosis de inóculo de 20 ml. de suspensión por bandeja (es decir 5 ml. por cada 20-30 plantas) con lo que la cantidad final de inóculo aplicada fue de 123 cfu/g.ss para CA013 y 60 cfu/g.ss para CM018. A los controles se les aplica la misma cantidad de una suspensión de Agar V-8 en agua realizada en idéntica forma.

Para las dos primeras inoculaciones del ensayo sobre plantas en su primer año de crecimiento, las cuales se realizan sobre plántulas de semillero en bandeja, el método de inoculación se explica en 3.2.4.3 y en 3.2.5.4.

5.2.2.2.3.2 Segunda inoculación (Inoculación-2).

Se realiza de la misma forma que la primera con las siguientes diferencias:
La inoculación se realiza el 7 de julio de 1994 (7ª semana desde la emergencia y 10ª semana desde la siembra) con las siguientes concentraciones:

CA013: $6{,}7.10^4$ esporas/ml.
CM018: $4{,}3.10^4$ esporas/ml.

Las cantidades finales han sido: 129 cfu/g.ss para CA013 y 83 cfu/g.ss para CM018.

5.2.2.2.3.3 Tercera inoculación (Inoculación-3).

El transplante se realizó desde los días 14 al 17 de noviembre de 1994.

Se disponen tres repeticiones por tratamiento: CA013 y CM018 inoculados en la primera fecha (a partir de ahora inoculación-1), inoculados en la segunda (inoculación-2) y un tercer grupo para inocular inmediatamente después del transplante (inoculación-3), además de los preceptivos controles sanos.

La inoculación-3 se realiza el 18 de noviembre de 1994 para CA013 y el 21 de noviembre de 1994 para CM018. Las concentraciones de inóculo utilizadas fueron:

Para CA013: $6{,}6.10^4$ esporas/ml.
Para CM018: $3{,}7.10^4$ esporas/ml.

Se riega el sustrato con 5 ml de inóculo por cada maceta (una planta por maceta). Como las plantas se encuentran ya en maceta el procedimiento de inoculación seguido es el expresado en 3.2.5.4. La dosis final de inóculo ha sido: 186 cfu/g.ss para CA013 y 104 cfu/g.ss. para CM018.

5.2.2.2.3.4 Cuarta inoculación (Inoculación-4).

Las inoculaciones en el segundo año de cultivo comienzan con la inoculación-4 que se realiza a principios de primavera, el 22 de abril de 1994. Las concentraciones de inóculo utilizadas fueron:

Para CA013: $6{,}0.10^4$ esporas/ml.
Para CM018: $3{,}3.10^4$ esporas/ml.

En esta inoculación y todas las siguientes el procedimiento de inoculación es el mismo que para la tercera inoculación, ya que, a partir del transplante todas las plantas se cultivan ya en maceta. Se reparten los 5 ml. de la suspensión de inóculo en cada tiesto con lo que la dosis final de inóculo ha sido de 169 cfu/g.ss para CA013 y 93 cfu/g.ss. para CM018.

5.2.2.2.3.5 Quinta inoculación (Inoculación-5).

La segunda inoculación del segundo año (inoculación-5) se produce el 16 de junio de 1994, al final de la primavera. Las concentraciones de inóculo utilizadas fueron:

Para CA013: $6{,}6.10^4$ esporas/ml.
Para CM018: $4{,}2.10^4$ esporas/ml.

El resto del procedimiento es semejante al ya citado para la inoculación-4. La dosis final de inóculo ha sido: 186 cfu/g.ss para CA013 y 118 cfu/g.ss.para CM018.

5.2.2.2.3.6 Sexta inoculación (Inoculación-6).

La última inoculación (inoculación-6) se realizó el 23 de noviembre de 1994, a mediados de otoño. Las concentraciones de inóculo utilizadas fueron:

Para CA013:6,6.10^4 esporas/ml.
Para CM018:3,5.10^4 esporas/ml.

El resto del procedimiento es también similar al antes expuesto para la inoculación-4. La dosis final de inóculo ha sido: 186 cfu/g.ss para CA013 y 99 cfu/g.ss. para CM018.

5.2.2.2.4 Condiciones ambientales

En el Anejo 13.2 se relacionan los datos de temperatura, precipitación y humedad relativa tomados en los Campos de Prácticas de la escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid correspondientes a los años 1992, 1993, 1994 y 1995, que dan idea de las condiciones meteorológicas en las que se llevaron a cabo los ensayos.

En el umbráculo se dispuso de un sistema de riego automatizado por microaspersión que compensó la falta de agua de los períodos secos. La frecuencia y dosis de riego varía con las condiciones ambientales naturales. Las características del equipo de riego instalado se detallaron en la parte general (epígrafe 3.2.5.5). Los riegos máximos se aplicaron en verano diariamente y consistieron en: 15 min. a las 8:00 h., 5 min. a las 14:00 h. y 10 min. a las 21:00 h. Al final del verano los riegos se redujeron a dos riegos diarios de 5 min. a las 8:00 h. y otros 5 min. a las 20:00 h. El riego se minimizó en invierno hasta un riego semanal de 5 min.

5.2.2.2.5 Técnicas de cultivo

Se respetaron al máximo las operaciones que normalmente se efectuaban en el vivero comercial que nos sirvió de referencia.

El semillero se abona con el complejo 8-15-15 en dos ocasiones, la primera justo después de la emergencia de la semilla, alrededor de finales de mayo y primeros de junio, y la segunda a primeros de agosto. El granulado se reparte a voleo a razón de 100-150 g/m^2 de era de semillero. Las plantas de segundo año se abonan con el mismo granulado en tres ocasiones (finales de junio, mediados de agosto y finales de septiembre) y, además, se les añade un abonado foliar en mayo con Actigil 887® (Rhône-Poulenc) al 3 ‰.

La escarda se realiza de forma manual durante todo el período de cultivo, en tres ocasiones durante el verano (a primeros de julio, primeros de agosto y primeros de septiembre).

Los únicos tratamientos fitosanitarios que se aplicaron fueron con productos insecticidas: varios tratamientos contra hormigas para proteger el semillero antes de la

nascencia con Amdro ® (10-15 g/m^2, m.a. hidrametilnona, 0,9%, Cyanamid) y tres tratamientos en primavera y verano (finales de junio, finales de julio y finales de agosto) con Sumifene50 ® (m.a. fenitrotion al 50%, Rhône Poulenc) al 1,5 ‰ contra larvas de dípteros y otros insectos y orugas.

5.2.2.2.6 Parámetros evaluados

5.2.2.2.6.1 Inoculaciones en primer año de cultivo

5.2.2.2.6.1.1 Semillero (plantas en bandejas)

Después de la inoculación y durante 10 semanas se registran los datos de número de plantas nacidas, muertas y dañadas (con síntomas de enfermedad) semanalmente para cada bandeja (tres repeticiones por tratamiento). Las plantas muertas se extraen y se procesan en laboratorio para evaluar los porcentajes de recuperación de patógeno en cumplimiento del último postulado de Koch. De todas ellas se recuperó el patógeno inoculado.

En el momento del transplante, de cada bandeja se toman las plantitas que han sobrevivido a las inoculaciones y 35 de ellas se plantan en maceta, mientras que otras 30 plantas se llevan al laboratorio para medir las longitudes de tallo y raíz principal.

La medida de las longitudes y pesos se explicó con detalle en el epígrafe 3.2.4.5.

5.2.2.2.6.1.2 Transplante (plantas en maceta)

En las plantas transplantadas se controla semanalmente la mortalidad (porcentaje de plantas muertas para 3 repeticiones de 35 plantas), el crecimiento (altura de las plantas medida en un total de 105 plantas para los controles y para la inoculación-3 y 33 plantas para el resto de los tratamientos, agrupadas en 3 repeticiones), y los síntomas aparentes de enfermedad, durante 21 semanas desde el transplante (8 semanas en el otoño y 13 semanas más en la primavera del año siguiente). Al final del ensayo se toman 10 plantas de cada bloque (30 por tratamiento) y se miden las longitudes de tallo y raíz principal, y sus respectivos pesos frescos y secos, por los procedimientos antes explicados en 3.2.4.5. Además, con otras 5 plantas por bloque (15 plantas por tratamiento) se examina la recuperación del patógeno, cuyo método se explicó en 3.2.3.

5.2.2.2.6.2 Inoculaciones en segundo año de cultivo

Desde el momento de la inoculación y durante un total de 11, 9 y 8 semanas, respectivamente para las inoculaciones 4, 5 y 6, se registran los datos de mortalidad, síntomas aparentes y crecimiento de las plantas (altura de tallo principal medida en 3 grupos de 30 plantas con un total de 90 plantas por tratamiento). Al final del ensayo se toman entre 10 y 15 plantas de cada tratamiento y se procesan en el laboratorio como se indicó anteriormente (apartado 3.2.3) con objeto de evaluar la recuperación de patógeno de las raíces.

Como ya se indicó en el apartado 3.2.5.6 al final del ensayo no se midieron parámetros de crecimiento de raíz, puesto que el desarrollo del sistema radicular de las plantas en maceta había sido intenso, ocupando el volumen de la maceta en su totalidad, y por esto se consideró inútil el intentar encontrar diferencias entre tratamientos.

5.2.2.2.7 Diseño y métodos estadísticos

Aquí también se plantean ensayos factoriales completamente aleatorizados con dos factores: hongo inoculado y momento de inoculación. Se consideran tres bloques por tratamiento que se constituyen en tres repeticiones para el caso del porcentaje de mortalidad y porcentaje de recuperación de patógeno.

Las explicaciones de los métodos se encuentran descritas en el epígrafe 3.2.6.

La mortalidad se estudia de dos formas. En la primera se comparan los tratamientos fijando la variable "tiempo", es decir, se estudian los valores de mortalidad para cada tiempo considerado mediante tests paramétricos y no paramétricos según cumplan o no las condiciones previas (apartados 3.2.6.2 y 3.2.6.3). La segunda consiste en construir las curvas de progreso de enfermedad a partir de la mortalidad acumulada en relación al tiempo. Las curvas de progreso de enfermedad se analizan mediante el cálculo del área bajo la curva y su comparación estadística a través de ANOVA F según lo expuesto en 3.2.6.4.

Los parámetros de crecimiento (longitudes y pesos) también se estudian mediante análisis de varianza, ya sea por métodos paramétricos o no paramétricos.

Las curvas de crecimiento del huésped para las inoculaciones en primer y segundo año se estudian aplicando regresiones lineales. Se comprueba el ajuste, se calculan los parámetros de la regresión y se comparan mediante el cálculo de los intervalos de confianza (consultar apartado 3.2.6.5.1).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

5.3.1.1 Incidencia de enfermedad: mortalidad

5.3.1.1.1 Mortalidad para tiempo fijo

5.3.1.1.1.1 Primer ensayo

5.3.1.1.1.2 Inoculaciones con P.irregulare (CA013)

Las dos inoculaciones se comportan de igual manera en su comparación respecto a su respectivo control sano (Fig.5.1. y Tablas 5.3 y 13.6.1); en ambos casos las diferencias de mortalidad empiezan a las 2 semanas de la inoculación y continúan durante todo el período de tiempo estudiado. Durante las primeras 3 semanas desde la inoculación se obtienen los mismos efectos con las dos inoculaciones (Fig.5.1). En las últimas semanas del ensayo (a partir de la 4ª semana) la inoculación-1 produce una mortalidad significativamente mayor que la inoculación-2 (Fig.5.1). De la comparación de los dos momentos de inoculación entre sí se deduce que, para un nivel de significación del 5%, la inoculación-1 es, desde la 4ª semana, más agresiva que la inoculación-2.

Al final del período considerado en el ensayo (6 semanas desde la inoculación) la mortalidad provocada por la inoculación-1 excede en casi un 20% la de la inoculación-2 (Fig.5.1).

En conclusión, la inoculación-1 ha sido marcadamente más agresiva que la inoculación-2, especialmente a partir de las primeras dos o tres semanas, provocando una mortalidad de plantas significativamente mayor. Una inmediata explicación para este hecho es que las plantas en el momento de la inoculacion-2 son cuatro semanas más adultas que en el momento de la inoculación-1 y por ello algo más vigorosas, o sus tejidos más lignificados, pudiendo así ofrecer mayor resistencia a la acción del patógeno (Fig.5.1).

Tabla 5.3.-Valores del Análisis de varianza según los tests de Kruskal-Wallis o F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada para los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum* en las inoculaciones 1 y 2 y sus respectivos controles sanos. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Primer ensayo.

P.irregulare.Mortalidad.			*P.paroecandrum*. Mortalidad.		
Tiempo (sdi)	ANOVA		Tiempo (sdi)	ANOVA	
	F(3,8) ó H(3,12)*	p		F(3,8) ó H(3,12)*	p
1*	5,227723	0,155900	1	8,949040	0,006175
2*	9,831343	0,020100	2	25,82021	0,000182
3*	10,18194	0,017100	3*	10,17293	0,017200
4	134,0399	0,000000	4	39,30045	0,000039
5	64,03205	0,000006	5	54,91515	0,000011
6	731,7086	0,000000	6	102,5644	0,000001

*No cumplen las hipótesis previas por lo que se analizan según Kruskal-Wallis.

5.3.1.1.1.3 Inoculaciones con P.paroecandrum (CL039)

Se recurrió a la estadística no paramétrica para evaluar los datos en los casos que no cumplían la condición previa de normalidad (Tablas 5.3 y 13.6.2).

De la comparación de cada inoculación con su control se desprende que, aplicando el test de Duncan, o Mann-Whitney según el caso, y para un nivel de significación del 5%, los valores de mortalidad de ambas inoculaciones fueron en todo momento significativamente diferentes de sus testigos (Tablas 5.3 y 13.6.2). Se obtiene el mismo resultado con los tres tests, con la única salvedad de la comparación de medias entre la inoculación-2 y su control en las semanas 1 y 2 al aplicar el test de Scheffé (Tablas 5.3 y 13.6.2).

De la comparación estadística de los dos momentos de inoculación entre sí se deduce que, para un nivel de significación p=0,05, la inoculación-1 y la inoculación-2 alcanzan niveles de mortalidad muy similares en la primera semana desde el momento de la inoculación (17,70% para la inoculación-1 y 16,83% para la inoculación-2) (Fig.5.2). Es a partir de entonces, en las siguientes dos semanas, cuando los valores de mortalidad se diferencian significativamente, suponiendo un incremento muy elevado para la inoculación-1 con lo que llega a alcanzar el 63% frente al 28% de la inoculación-2 a las 2 semanas de la inoculación y el 67% frente al 34% a las tres semanas de la inoculación (Fig.5.2). Las diferencias entre ambas inoculaciones se van reduciendo progresivamente hasta suponer una diferencia de solo un 9% a las 4 semanas. Tan es así que incluso la inoculación-2 supera en mortalidad acumulada a la inoculación-1 en las semanas 5 y 6 desde la inoculación. Este efecto puede apreciarse gráficamente en las curvas de progreso de enfermedad (Fig.5.2).

Aún cuando la diferencia en la mortalidad producida en las semanas 2 y 3 desde la inoculación es muy acusada en favor de la inoculación-1, el efecto sobre la mortalidad del huésped al final del ensayo es el mismo para las dos inoculaciones, es decir, al cabo de 6 semanas desde el momento de la inoculación, la inoculación realizada en plantas de dos semanas o de seis semanas desde la emergencia dio lugar a la muerte de un porcentaje de plántulas similar (alrededor del 80%) (Fig.5.2).

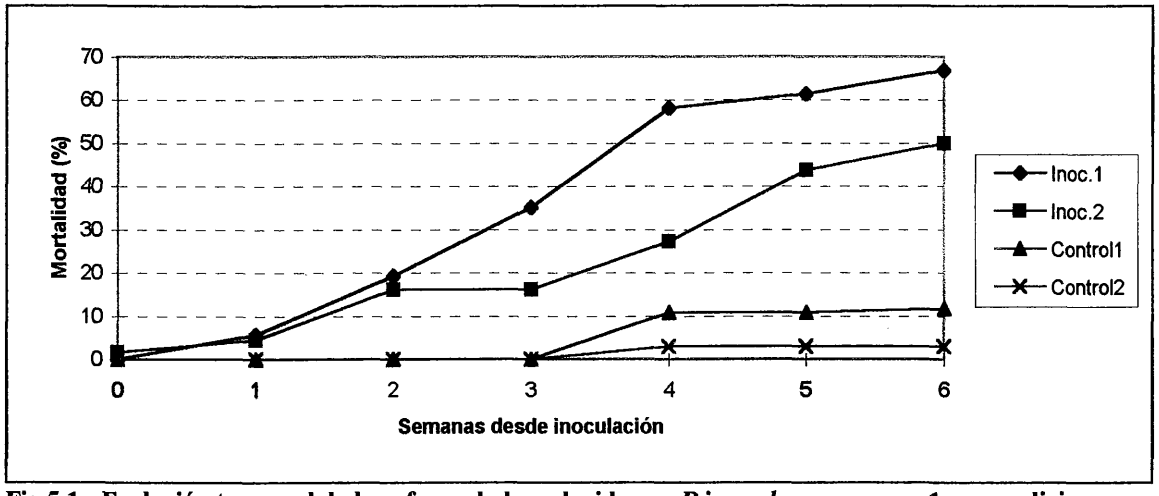


Fig 5.1.- Evolución temporal de la enfermedad producida por *P.irregulare* en ensayo 1, en condiciones controladas.

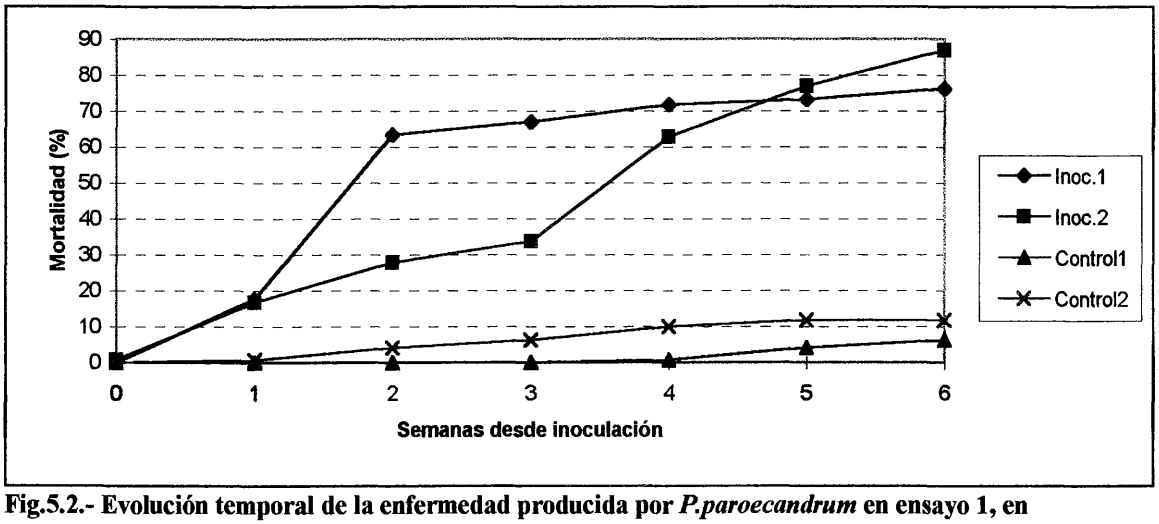


Fig.5.2.- Evolución temporal de la enfermedad producida por *P.paroecandrum* en ensayo 1, en condiciones controladas.

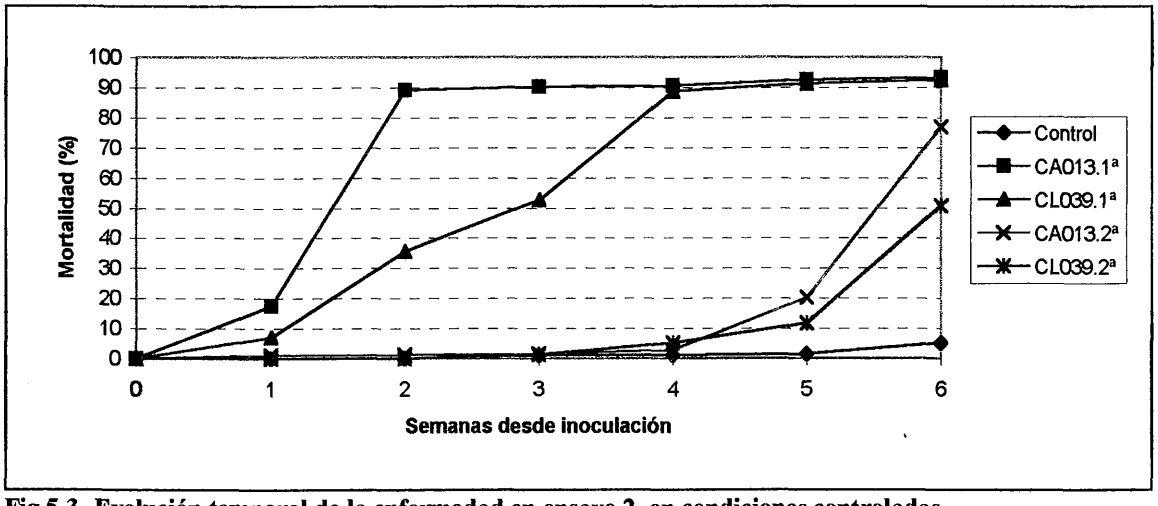


Fig.5.3.-Evolución temporal de la enfermedad en ensayo 2, en condiciones controladas.

5.3.1.1.1.4 Comparación de ambos aislados.

Al final del ensayo la inoculación-2 con CL039 alcanza e incluso supera la mortalidad de la inoculación-1. El aislado CL039 parece haber sido más agresivo que CA013 (a los 7 días presenta una mortalidad superior).

La tendencia parece ser que la inoculación-1 se manifiesta siempre más agresiva que la inoculación-2 (sobre todo durante las semanas 2 a 4 desde la inoculación). En el caso del aislado CL039 es en la primera semana desde la inoculación cuando se manifiesta la enfermedad para ambas inoculaciones, 7 días antes que con CA013. A las 2 semanas la mortalidad producida por la inoculación-1 es significativamente mayor que la de inoculación-2 . Esto se cumple durante 2 semanas. A las 4 semanas la inoculación-2 iguala en mortalidad a la inoculación-1.

5.3.1.1.1.5 Segundo ensayo

La representación gráfica de la evolución de los valores medios de mortalidad (en porcentaje) en función del tiempo transcurrido desde el momento de la inoculación (Fig.5.3) indica con claridad lo que posteriormente ratifica el análisis estadístico de los datos, y es la diferencia de efectos entre las inoculaciones 1 y 2 con independencia del hongo inoculado.

La mortalidad acumulada ha sido muy elevada para la inoculación-1 , tanto con el aislado CA013 como con el CL039 murieron más del 90% de las plantas a las 6 semanas de la inoculación (Fig.5.3). Sin embargo, aún cuando la inoculación-2 para ambos inóculos ha registrado valores de mortalidad bajos durante casi todo el ensayo, es en las dos últimas semanas cuando incrementa su acción y consigue afectar a cerca del 80% para el aislado CA013 y del 50% para el aislado CL039 a las 6 semanas de la inoculación (Fig.5.3).

Los valores de la variable recogidos durante las primeras 4 semanas no cumplen las hipótesis previas de ANOVA F, ni siquiera después de la transformación, y se analizan aplicando los métodos no paramétricos de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. En las 2 últimas semanas se emplea la estadística paramétrica. El resultado del análisis de varianza aplicado a todos los tratamientos, ya sea por Kruskal-Wallis o F de Snedecor, advierte la existencia de diferencias significativas ($p<0,05$) para todos los tiempos (Tabla 5.4).

Tabla 5.4.- Valores del Análisis de varianza según los tests de Kruskal-Wallis o F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada para los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum* en las inoculaciones 1 y 2 y el control sano en el segundo ensayo. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Variable: mortalidad (%)		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(4,25) ó H(4,30)***	**p**
1*	15,07666	0,004600
2*	23,34406	0,000100
3*	22,74484	0,000100
4*	23,05501	0,000100
5	66,14438	0,000000
6	44,88662	0,000000

*No cumplen las hipótesis previas por lo que se analizan según Kruskal-Wallis.

5.3.1.1.1.6 Inoculaciones con P.irregulare (CA013)

La posterior comparación de medias de ambas inoculaciones entre sí y con el control sano corrobora los resultados apreciados en la figura 5.7 : para cada semana y durante todo el ensayo la inoculación-1 ha producido la muerte de las plantas en una proporción significativamente mayor que la inoculación-2 ($p<0,05$) (Tabla 13.6.3). También en todo momento la inoculación-1 se distingue del control, mientras que la inoculación-2 solo es distinta al control en las últimas dos semanas (Tabla 13.6.3), momento en el que produce la muerte a un gran número de plantas (20% de mortalidad acumulada en la semana 5 y 50% en la semana 6 frente al 2% en la semana 4) (Fig. 5.3).

5.3.1.1.1.7 Inoculaciones con P.paroecandrum (CL039)

Resultados bastante similares se obtienen con el aislado CL039 (Tabla 13.6.4). Con excepción de la primera semana desde la inoculación, en la que ambas inoculaciones son iguales al control sano e iguales entre sí ($p>0,05$), durante el resto de las semanas del ensayo la inoculación-1 es significativamente distinta ($p<0,05$) de la inoculación-2 y del control (Tabla 13.6.4). La inoculación-2 es igual al control solo durante las 3 primeras semanas desde la inoculación (Tabla 13.6.4).

5.3.1.1.1.8 Comparación de ambos aislados

La Tabla 13.6.5 recoge las comparaciones de las medias de todos los tratamientos, salvo el control. De las comparaciones entre los dos inóculos y las dos inoculaciones para la cuatro combinaciones posibles, al nivel de significación del 5%, lo más destacado es que, en general, el efecto del hongo se disipa frente al efecto del momento de inoculación: no hay diferencias entre las inoculaciones-1 con ambos aislados y lo mismo sucede con las inoculaciones-2 (Tabla 13.6.5).

5.3.1.1.2 Ajuste al modelo linealizable

5.3.1.1.2.1 Primer ensayo

Como se expuso en el epígrafe 5.2.2.1.6 anterior, los datos de mortalidad acumulada en función del tiempo desde la inoculación, es decir las curvas de incidencia de enfermedad para ambos inóculos en las inoculaciones 1 y 2 se ajustan por regresión lineal a las formas linealizadas de los modelos Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz. En el Anejo 13.7 (Tabla 13.7.1) se relacionan los modelos ensayados con los valores de los parámetros. El resultado fue que todas las curvas de progreso de enfermedad se ajustaban mejor al **modelo Monomolecular** y, por tanto, podían compararse los parámetros de la regresión entre sí. La distribución de los residuos al azar corrobora la idoneidad del modelo.

El análisis según Durbin-Watson (Tabla 13.7.2) resulta que, en todos los casos, el valor del coeficiente se sitúa entre los límites aceptables, ya citados en el apartado 3.2.6.5.2 al tratar la independencia de los residuos, con excepción de los residuos del modelo monomolecular correspondiente a la inoculación-2 con el aislado CA013 que muestran una ligera correlación positiva que consideramos asumible.

La comparación de las pendientes del modelo por el método de los intervalos de confianza (epígrafe 3.2.6.5.1) revela que para la inoculación realizada con el aislado CA013 son significativamente distintas entre si para un nivel de significación (p) del 5%; es decir, que existen diferencias significativas entre la curva que representa la incidencia de la enfermedad cuando el hongo se inocula sobre plantas de 2 semanas de edad desde la emergencia de la semilla y la misma curva para el caso de la inoculación sobre plantas de 6 semanas de edad desde la emergencia. Por el contrario, para las inoculaciones con el aislado CL039 no hay diferencias significativas entre las pendientes para los dos momentos de inoculación (Tabla 5.5). En el ANEJO 13.7 (Tabla 13.7.3 a Tabla 13.7.8) se resúmen los resultados del ajuste a los modelos.

Tabla 5.5.-Valores del intervalo de confianza para la comparación de la pendiente del modelo monomolecular para las inoculaciones 1 y 2 con los inóculos CA013 y CL039 en el primer ensayo.

Intervalos de confianza	
	Inoculación-1 - Inoculación-2
CA013	0,020931892
	0,004770235
CL039	0,050981776
	-0,015302444

5.3.1.1.2.2 Segundo ensayo

Como ya se expuso en el apartado 5.2.2.1.6 no se procedió al estudio de las curvas de progreso de enfermedad en su ajuste a los modelos en este segundo ensayo.

5.3.1.1.3 Comparación de las AUDPC.

5.3.1.1.3.1 Primer ensayo

La variable AUDPC estándar (AUDPCstd), que se mide en tanto por ciento (%), fue sometida a la transformación arcsen $\sqrt{y/100}$ con lo que cumple con las hipótesis previas de normalidad y homogeneidad de varianza.

Tanto para las inoculaciones con el aislado CA013 de *P.irregulare* como para las realizadas con CL039 de *P.paroecandrum* , el resultado del ANOVA F resulta en diferencias significativas al nivel de significación del 5% (F=163,55; p=0,000000 y F=50,745; p=0,000015, respectivamente).

Las tres pruebas de comparación múltiple de medias empleadas arrojan el mismo resultado (Tabla 5.6): todos los tratamientos son distintos entre sí para las inoculaciones con CA013, mientras que, con CL039, no se detectan diferencias significativas entre ambas inoculaciones, ni entre ambos controles, aunque sí entre cada inoculación y su respectivo control sano. Se confirman así los resultados obtenidos al evaluar las pendientes del modelo monomolecular que siguen las epidemias (ver apartado 5.3.1.1.2).

Tabla 5.6.-Comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) de las inoculaciones 1 y 2 para los valores de mortalidad. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes según Duncan (p< 0,05). Primer ensayo.

Inóculo	AUDPCstd (%)	
	P.irregulare	P.paroecandrum
Inoculación-1	248,46±2,76 a	386,44±18,39 a
Control-1	32,30±2,90 c	9,12±2,48 b
Inoculación-2	156,02±11,00 b	305,82±29,70 a
Control-2	8,75±0,51 d	45,07±6,29 b

5.3.1.1.3.2 Segundo ensayo

Se estudiaron los valores de AUDPC estándar (AUDPCstd) mediante el análisis de varianza ANOVA F y los tests paramétricos de comparación de medias LSD y Duncan. Del resultado del análisis de varianza (F=101,4782, p=0,000000) se concluye que existen diferencias significativas para todos los tratamientos.

Las medias de los tratamientos se reproducen en la Tabla 5.7 y de su comparación, tanto aplicando el test de Duncan como el LSD, al nivel de significación del 5%, se deduce que todos los tratamientos son distintos al control y que la inoculación-2 con ambos hongos es diferente a la inoculación-1 (el hongo no ha tenido ningún efecto diferenciador). Se encuentran diferencias entre ambos inóculos para la inoculación-1, pero ello es debido a la elevada virulencia que ha exhibido el aislado CA013 (Tabla 5.7).

Los datos se agrupan y se elimina el control para el estudio de las interacciones entre los dos factores: hongo inoculado y momento de inoculación. Según esto, es el momento de inoculación el efecto principal. El hongo inoculado no tiene ningún efecto (Tabla 5.8).

Tabla 5.7.-Comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) de las inoculaciones 1 y 2 para los valores de mortalidad. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes según Duncan (p< 0,05). Segundo ensayo.

Inóculo	AUDPCstd (%.)	
	Inoculación1	Inoculación2
P.irregulare	67,28±2,78 a	7,38±2,38 c
P.intermedium	53,57±4,78 b	9,16 ±2,16 c
Control	1,03±0,27 d	

Tabla 5.8.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05). Segundo ensayo.

Factor	Variable dependiente: AUDPCstd	
	F	p
Hongo	1,4357	0,244843
Inoculación	222,7926	0,000000*
Interacción	4,9195	0,038295*

5.3.1.2 Recuperación del patógeno

Se obtiene el mismo resultado en ambos ensayos. Los datos del porcentaje de recuperación de patógeno reaislado de las plantas supervivientes en el segundo ensayo (medias de 6 repeticiones y sus errores típicos) se resumen en la Tabla 5.9. No se detectó ningún hongo en los controles sanos.

Tabla 5.9.-Efecto de la inoculación y del hongo inoculado sobre la recuperación de patógeno. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p< 0,05) según ANOVA Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney.

Inóculo	Recuperación de patógeno (%)	
	Inoculación-1	Inoculación-2
P.irregulare	98,33±1,67 a	100,00±0,00 a
P.intermedium	100,00±0,00 a	98,33± 1,67 a
Control	0,00±0,00 b	

Del análisis no paramétrico mediante el test U de Mann-Whitney se deduce que no ha habido ningún efecto debido al aislado ni debido al momento de la inoculación sobre esta variable (Tablas 5.9 y 13.6.7). El reaislamiento del patógeno ha sido prácticamente del 100% en las plantas supervivientes al tratamiento (Fig.5.4.) con independencia del tipo de hongo inoculado y la edad de la planta en el momento de la inoculación.

Además, también del 100% de las plantas muertas se recuperó el hongo que había sido inoculado.

En general, las plantas supervivientes mostraron cierto grado de necrosis y estrangulamientos de cuello si bien hemos comprobado que el hongo también se recupera de raíces asintomáticas, lo que confirma los resultados obtenidos por REY ET AL.(1996) cuando afirman que: "las raíces (de plantas de tomate) asintomáticas obtenidas de cultivos sin suelo se pueden considerar colonizadas por *Pythium* spp".

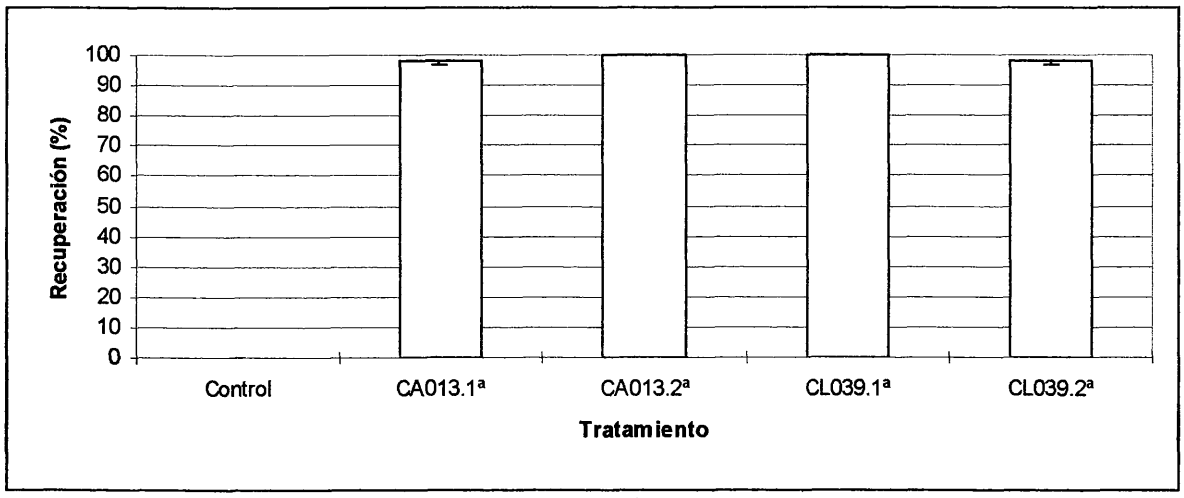


Fig.5.4.- Recuperación de patógeno en ensayo 2, en condiciones controladas.

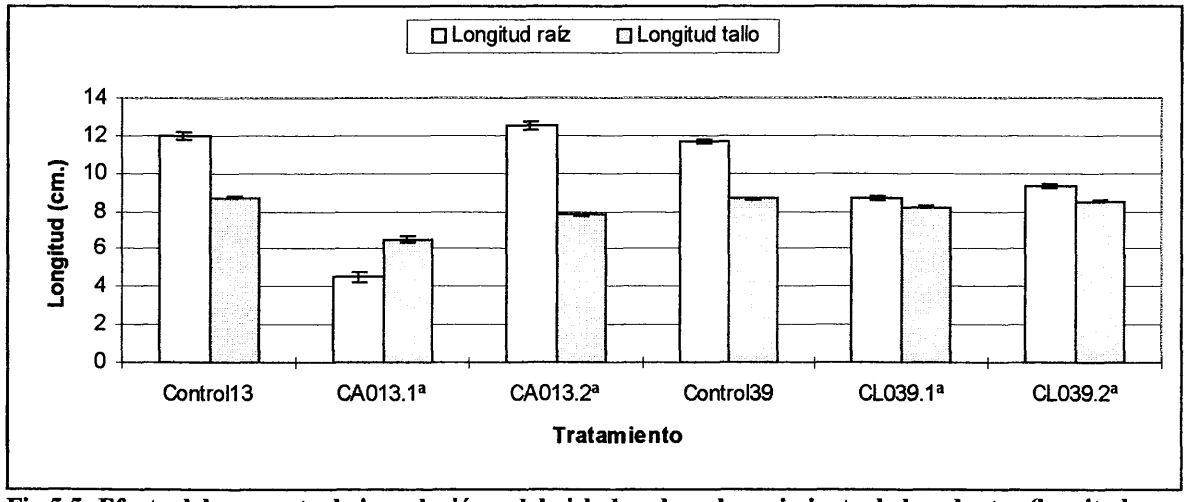


Fig.5.5.-Efecto del momento de inoculación y del aislado sobre el crecimiento de las plantas (longitudes medias) para el ensayo 1, en condiciones controladas.

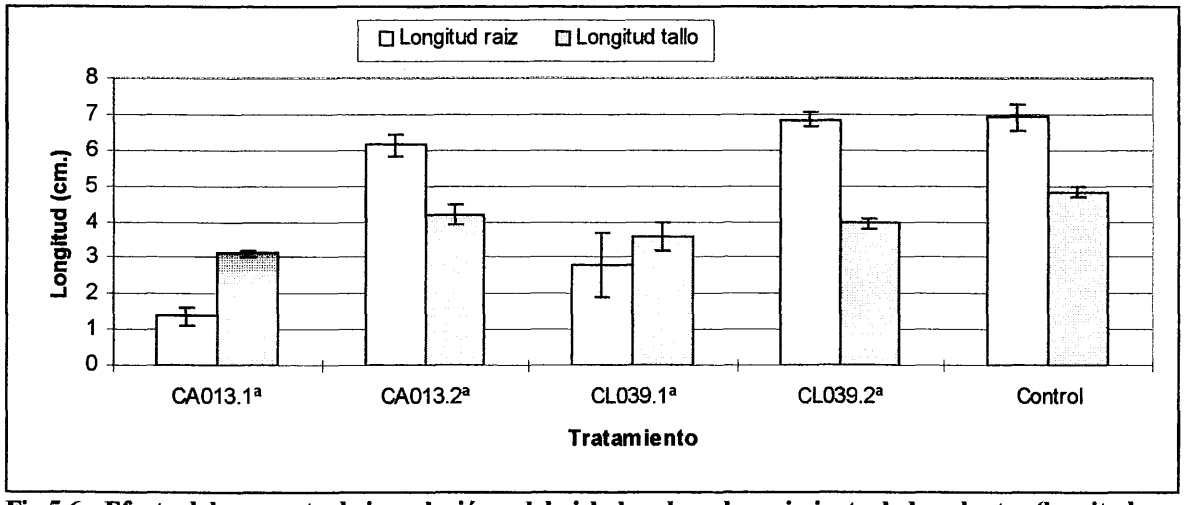


Fig.5.6.- Efecto del momento de inoculación y del aislado sobre el crecimiento de las plantas (longitudes medias) para el ensayo 2, en condiciones controladas.

5.3.1.3 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes, pesos frescos y secos

5.3.1.3.1 Primer ensayo

El estudio estadístico de las longitudes de tallo y de raíz principal de las plantas asintomáticas supervivientes a las inoculaciones se ha hecho en función de su adecuación o no a la distribución normal: mediante la estadística no paramétrica para la variable "longitud de raíz principal" y aplicando tests paramétricos para la variable "longitud de tallo". El número de datos total recogido para cada tratamiento ha sido de 30, con la excepción de la inoculación-1 con CA013 en donde solo se dispuso de 6 plantas supervivientes al tratamiento.

Los datos obtenidos se representan gráficamente en la Figura 5.5 y el resultado de las comparaciones estadísticas en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10.-Efecto de la inoculación sobre las longitudes de raíz principal y tallo de las plantas supervivientes al final del ensayo para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según test LSD de comparación de medias para la variable "longitud de tallo" y test U de Mann-Whitney para la variable "longitud de raíz principal". Primer ensayo.

Inóculo	Longitud de raíz principal (cm.)		Longitud de tallo (cm.)	
	P.irregulare	P.paroecandrum	P.irregulare	P.paroecandrum
Inoculación-1	4,53±0,2853 d	8,68±0,0873c	6,48±0,1641 c	8,21±0,0575 ab
Inoculación-2	12,52±0,1846 a	9,37±0,1031 bc	7,83±0,0702 bc	8,52±0,0582 ab
Control	12,00±0,1820 ab	11,64±0,1106 ab	8,75±0,0618 a	8,67±0,0509 ab

*Según Duncan y Scheffé no hay diferencias significativas en ningún caso para la longitud de tallo.

**Al aplicar los tests paramétricos de Duncan y Scheffé a los valores de la variable "longitud de raíz principal" se obtiene exactamente el mismo resultado que aplicando el no paramétrico de Mann-Whitney.

5.3.1.3.1.1 Longitud de tallo.

En las inoculaciones con *P. irregulare* (CA013) no hay diferencias significativas (p=0,05) en ningún caso al aplicar los tests de comparación de medias de Duncan y Scheffé (Tabla 5.10). Según LSD (p=0,05) no hay diferencias entre las dos inoculaciones, pero ambas son distintas a su control (Tabla 5.10). Es decir, de acuerdo con el test menos exigente para aceptar diferencias, si ha existido una cierta reducción en el crecimiento en longitud del tallo de las plantas sometidas a la acción del hongo independientemente del momento en que ha sido inoculado. La inoculación-1 ha supuesto una reducción significativa del 26,94% respecto al control sin inocular. La inoculación-2 ha producido una reducción cercana al 10,51% (Fig. 5.5).

Para el caso de las inoculaciones con *P. paroecandrum* (CL039), el resultado de los tres tests de comparación de medias (LSD, Duncan y Scheffé) al nivel de significación del 5% resulta en que no hay diferencias significativas en ningún caso para este parámetro (Tabla 5.10).

En general, de tales resultados se deduce que el crecimiento en longitud del tallo no se ha visto afectado por las inoculaciones con los patógenos, con independencia del aislado inoculado y del momento en que se produjo la inoculación con relación a la edad del huésped.

5.3.1.3.1.2 Longitud de raíz.

La inoculación-1 con *P. irregulare* (CA013) provoca, según el test U de Mann-Whitney, una **clara y significativa reducción** en la longitud de la raíz principal en las plantas supervivientes tanto respecto al control como respecto a la inoculación-2 (Tabla 5.10), cifrándose dicha reducción en un 62,25% (Fig.5.5). La inoculación-2 no se diferencia del control

Sin embargo, con el aislado CL039 de *P. paroecandrum* y según el mismo test, no hay diferencias entre ambas inoculaciones (Tabla 5.10). La reducción media de la longitud de raíz es de un 25,43% para la inoculación-1 comparada con el control sano. Tampoco en este caso hay diferencias significativas entre la inoculación-2 y el control (Tabla 5.10).

En resumen, la longitud de raíz siempre se muestra más afectada que el tallo. Las plantas inoculadas en la inoculación-2 no ven afectado el crecimiento en longitud de su raíz principal. La inoculación-1 si parece haber reducido este parámetro, de forma más evidente en las inoculaciones con el aislado CA013 de *P.irregulare* que con el CL039 de *P.paroecandrum*.

5.3.1.3.2 Segundo ensayo

En el segundo ensayo, además de los datos de longitud, recogimos también datos de pesos frescos y secos del sistema radicular y de la parte aérea de las plantas supervivientes al tratamiento infectivo. Se trabajó con los valores medios de 6 repeticiones.

Todas las variables se sometieron a la transformación $y = \sqrt{x}$, con excepción del peso seco de parte aérea que se sometió a la transformación logarítmica $y = Ln(x)$. A las variables

de "peso" cuyos valores eran inferiores a la unidad se les añadió dicha cantidad antes de calcular la raíz cuadrada. De esta forma se consigue que cumplan las hipótesis previas de normalidad y homoscedasticidad y puedan ser evaluados mediante los tests paramétricos.

5.3.1.3.2.1 Longitud de tallo.

5.3.1.3.2.1.1 Comparación con el control

La aplicación del análisis de varianza ANOVA F de Snedecor detecta diferencias significativas entre todos los tratamientos al nivel de significación del 5% (F=10,85933; p=0,000043). Todos los tratamientos se distinguen del control según Duncan (p<0,05) con excepción de la inoculación-2 con *P.irregulare* (p=0,055336) (Tabla 5.11) (Fig.5.6).

5.3.1.3.2.1.2 Interacciones hongo×momento de inoculación.

No hay interacción entre las dos variables independientes (valores de "F" y "p" en Tabla 5.12). El efecto principal parece ser la inoculación. Se obtienen los mismos resultados con independencia del aislado que se considere.

Tabla 5.11.-Efecto de la inoculación sobre las longitudes de raíz principal y tallo de las plantas supervivientes al final del ensayo para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según test Duncan de comparación de medias. Segundo ensayo.

	Longitud de raíz principal (cm.)		Longitud de tallo (cm.)	
Inóculo	P.irregulare	P.paroecandrum	P.irregulare	P.paroecandrum
Inoculación-1	1,39± 0,2552 c	2,80±0,9186 b	3,11± 0,0787 c	3,59± 0,3721 cb
Inoculación-2	6,13± 0,3106 a	6,83± 0,2035 a	4,22± 0,2792 ab	3,95± 0,1379 b
Control	6,92± 0,3507 a		4,82± 0,1435 a	

*Se obtiene el mismo resultado aplicando el test LSD a la variable "longitud de raíz".

Tabla 5.12.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05). Segundo ensayo.

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Hongo	5,8553	0,026334*	0,18495	0,672257
Inoculación	105,3597	0,000000*	12,12007	0,002665*
Interacción	1,7261	0,205406	2,79349	0,111942

Según esto, al agrupar las variables y estudiar el efecto del momento de inoculación se detectan diferencias significativas entre ambas inoculaciones (p=0,002665), parece que la longitud del tallo es menor para las inoculaciones realizadas sobre plantas de menor edad.

5.3.1.3.2.2 Longitud de raíz principal.

5.3.1.3.2.2.1 Comparación con el control

Según ANOVA F existen diferencias significativas para el conjunto de todos los tratamientos y el control (F=43,08961; p=0,000000). En la Tabla.5.11. se recogen los valores de las medias y el resultado del test de comparación múltiple según Duncan. La inoculación-2 con ambos aislados no resulta diferente del control. Por el contrario, la inoculación-1 si presenta una reducción significativa de la longitud de raíz principal respecto a las plantas sanas, independientemente del hongo inoculado. La reducción llega a ser de un 80% para las plantas inoculadas con *P.irregulare* y de un 60% para *P.paroecandrum* (Fig.5.6).

5.3.1.3.2.2.2 Interacciones hongo×momento de inoculación.

El estudio de las interacciones revela que no hay interacción entre las variables "hongo inoculado" y "momento de inoculación" para este carácter (Tabla 5.12). Ambos efectos por separado son significativos, es decir, existen diferencias tanto entre inoculaciones como entre hongo inoculado. En este último caso, como se deduce de la Tabla 5.11, las diferencias se deben a que el efecto del patógeno sobre la longitud de raíz principal ha sido más acusado en el caso del aislado de *P.irregulare* que en el de *P.paroecandrum*.

5.3.1.3.2.3 Pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes al final del ensayo.

5.3.1.3.2.3.1 Comparación con el control

Los valores del estadístico F del análisis de varianza para los pesos fresco y seco de parte aérea (F=0,84622, p=0,510406 y F=22,80092, p=0,000000 respectivamente) arrojan conclusiones contradictorias entre sí. Mientras que no hay diferencias significativas entre tratamientos para los valores de peso fresco, si que las hay, y muy acusadas para el peso seco (Tablas 5.13 y 5.14) (Fig.5.7). El test de Duncan aprecia un aumento significativo del peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas más tempranamente (inoculación-1) respecto a las inoculadas posteriormente e incluso respecto a las sanas. Este efecto es independiente del tipo de hongo inoculado (Tablas 5.13 y 5.14).

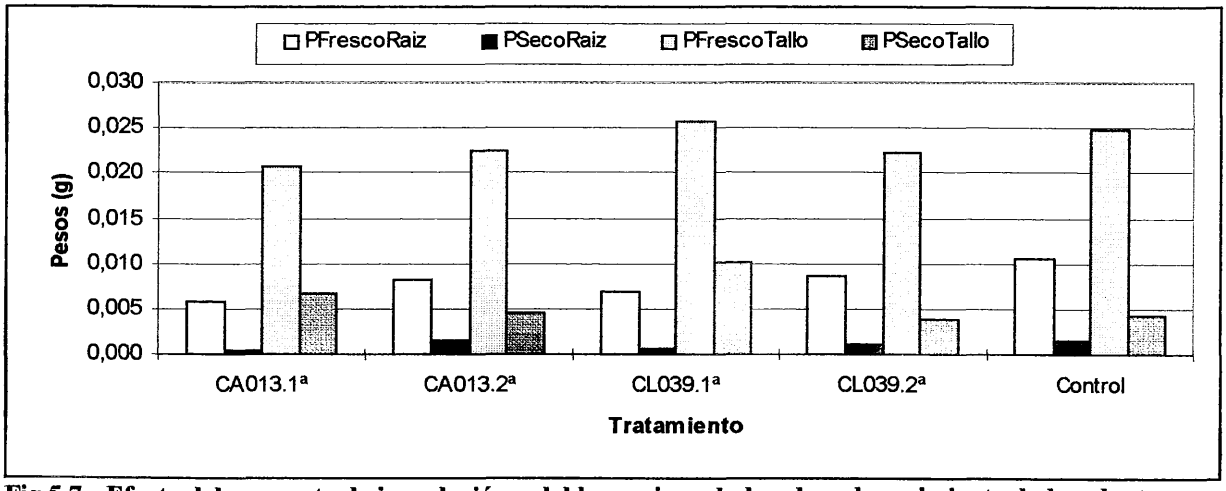


Fig.5.7.- Efecto del momento de inoculación y del hongo inoculado sobre el crecimiento de las plantas supervivientes (pesos frescos y secos de raíz y parte aérea) para el ensayo 2, en condiciones controladas.

Tabla 5.13.-Efecto de la inoculación sobre los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de las plantas asintomáticas al final del ensayo para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según el test de Duncan. Segundo ensayo.

	Peso fresco de raíz (mg.)		Peso fresco de parte aérea (mg.)	
Inóculo	P.irregulare	P.paroecandrum	P.irregulare	P.paroecandrum
Inoculación-1	5,89± 0,73 b	6,90± 1,61 ab	20,66± 1,58 a	25,67± 4,06 a
Inoculación-2	8,26± 0,91 ab	8,71± 0,82 ab	22,35± 2,41 a	22,33± 1,01 a
Control	10,641± 0,25 a		24,81± 1,87 a	

Se obtiene el mismo resultado aplicando los tests LSD y Scheffé para ambas variables.

En cuanto al sistema radicular, los valores de F para los pesos frescos y secos (F=4,63553, p=0,006838 y F=21,05573, p=0,000000 respectivamente) concuerdan en la detección de diferencias significativas. En las Tablas 5.13 y 5.14 se comprueba como el tratamiento con CA013 en la inoculación-1 presenta un peso fresco de sistema radicular significativamente menor que las plantas sanas, aunque no se diferencia del resto de los tratamientos. El peso seco se ha visto significativamente reducido para ambos hongos en la inoculación-1 con relación al control y a la inoculación-2 (Tabla 5.14) (Fig.5.7).

Tabla 5.14.-Efecto de la inoculación sobre los pesos secos de sistema radicular y parte aérea de las plantas asintomáticas al final del ensayo para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según el test de Duncan. Segundo ensayo.

	Peso seco de raíz (mg.)		Peso seco de parte aérea (mg.)*	
Inóculo	P.irregulare	P.paroecandrum	P.irregulare	P.paroecandrum
Inoculación-1	0,54± 0,06 c	0,68± 0,16 c	6,61± 0,54 b	10,11± 1,42 a
Inoculación-2	1,43± 0,10 b	1,15± 0,08 a	4,47± 0,35 c	3,87± 0,18 c
Control	1,50± 0,09ab		4,39± 0,17 c	

*Se obtiene el mismo resultado aplicando los tests LSD y Scheffé.

5.3.1.3.2.3.2 Interacciones hongo×momento de inoculación.

El estudio de las interacciones informa de la existencia de interacción entre los factores "hongo inoculado" y "momento de inoculación" para los pesos secos pero no para los frescos (Tabla 5.15).

Como ya hemos visto no hay ningún efecto de los factores ensayados sobre la variable "peso fresco de parte aérea" (Tabla 5.15). El momento de inoculación es el efecto principal que influye sobre las otras tres variables. El tipo de hongo inoculado no altera el resultado del análisis (Tabla 5.15).

Tabla 5.15.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05). Segundo ensayo.

Factor	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	5,556334	0,465371	1.244081	0,279356
Inoculación	4,534683	0,047272*	0.139931	0,712719
Interacción	0,080176	0,780290	1.260260	0,276354

Factor	Variable dependiente			
	Peso seco raíz		Peso seco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	0,49485	0,490770	2,78941	0,112186
Inoculación	49,98462	0,000001*	63,24666	0,000000*
Interacción	4,61809	0,045489*	10.86388	0,004016*

5.3.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO

5.3.2.1 Incidencia de enfermedad:mortalidad

Los datos de mortalidad semanal se analizan mediante dos técnicas: por un lado se comparan estadísticamente los datos de porcentaje, previamente transformados (epígrafe 3.2.6.2) con objeto de cumplir las hipótesis previas que requiere el ANOVA F, fijando la variable "tiempo" (para cada semana desde la inoculación), y en segundo lugar, se calcula el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) para todo el período de toma de datos considerado (10 semanas desde la inoculación) y se comparan igualmente mediante análisis de varianza ANOVA F.

5.3.2.1.1 Mortalidad para la inoculación 1

La incidencia de enfermedad en la inoculación sobre plantas más jóvenes (inoculación-1) ha sido elevada, rondando el 10% de mortalidad acumulada a las 10 semanas (2,5 meses) de la inoculación para los bloques inoculados con *P.irregulare*, y el 25% para los inoculados con *P.intermedium* (Figura 5.8).

La enfermedad parece más acusada en el caso de *P.intermedium*, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa al 5% con ninguno de los tres tests de comparación de medias estudiados (Tabla 5.16), probablemente debido a la elevada variabilidad de los datos, y ello a pesar de que la concentración de esporas en el inóculo de este era aproximadamente la mitad que en el de *P. irregulare*. Este resultado contrasta con el obtenido repetidamente en los bioensayos de laboratorio en donde la virulencia de *P.intermedium* ha sido siempre inferior.

Tabla 5.16.-Valores del test ANOVA F de los datos de mortalidad acumulada para las inoculaciones 1 y 2 con *P.irregulare*, *P.intermedium* y el testigo sano. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05).

Inoculación-1.Mortalidad.			Inoculación-2. Mortalidad.		
Tiempo	ANOVA		Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(2,6)	p	(sdi)	F(2,6)	p
1*	-----	-----	1	0,077073	0,926724
2	0,526282	0,615762	2	2,042535	0,210580
3	27,29644	0,000971	3	1,264366	0,348177
4	27,29644	0,000971	4	1,858874	0,235373
5	16,88609	0,003433	5	2,031185	0,212008
6	7,751839	0,021723	6	1,858874	0,235373
7	11,78333	0,008357	7	1,858874	0,235373
8	10,16805	0,011825	8	1,858874	0,235373
9	9,826372	0,012795	9	2,031185	0,212008
10	8,834534	0,016290	10	2,031185	0,212008

*No cumplen las hipótesis previas por lo que se analizan según Kruskal-Wallis H(2,N=9)=2,0000; p=0,3679.

Por otro lado, la mortalidad producida durante las primeras 4-5 semanas (primer mes) desde la inoculación es prácticamente la misma para ambos inóculos (Fig.5.8).

Ambos inóculos necesitan un tiempo de 3 semanas aproximadamente para producir una mortalidad significativa (3-4% aproximadamente) respecto al control sano, para las condiciones ambientales de los meses de junio y julio y para las condiciones morfológicas y fisiológicas de las plántulas en semillero de 1-2 meses desde la emergencia (Fig.5.8).

Hay que tener en cuenta otros datos que no aparecen en las gráficas pero que se apreciaron durante las observaciones del ensayo: existió también un alto porcentaje de plantas que no murieron pero que sufrieron algunos daños menores y fueron capaces de sobrevivir al patógeno; dichas plantas mostraron síntomas externos, tales como acículas cloróticas y necrosadas y algunas raíces necrosadas aun cuando la planta es capaz de emitir raicillas secundarias y recuperarse; por otro lado, algunas semillas son capaces de germinar normalmente en presencia del patógeno.

Al transformar los datos de mortalidad en tanto por uno se cumplen las hipótesis previas de normalidad y homogeneidad de varianzas, con excepción de la semana 1ª, por lo que se aplica el análisis ANOVA F desde la segunda semana hasta la décima y última, resultando que desde la 3ª a la 10ª se detectan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tabla 5.16). La primera semana se analiza por Kruskal-Wallis.

La comparación múltiple de medias por los métodos LSD, Duncan y Scheffé al 5% de significación (ver Tabla 13.5.1) determina que, en todos los tiempos, a partir de la 2ª semana desde la inoculación, CM018 se diferencia significativamente del control sin inocular. El tratamiento con CA013 no es significativamente distinto del control en las semanas 6ª y 10ª aunque por un margen muy pequeño (LSD p=0,0645 y p=0,0520 respectivamente). En ningún momento se detectan diferencias significativas entre los dos inóculos.

5.3.2.1.2 Mortalidad para la Inoculación 2

En este caso, cuando las plantas se inoculan más tardíamente, la incidencia de la enfermedad a las 10 semanas de la inoculación es muy inferior a la alcanzada por la inoculación-1. Tan solo se alcanzan valores de mortalidad de aproximadamente el 3% para ambos inóculos (Figura 5.9).

Después de la transformación, el resultado del análisis ANOVA (Tabla 5.16.) sugiere que en ningún momento se detectan diferencias significativas entre los tratamientos ni entre estos y los controles sanos. En este punto hay que tener en cuenta la gran variabilidad dentro de los grupos que puede anular pequeñas diferencias entre ellos (Tabla 13.5.2).

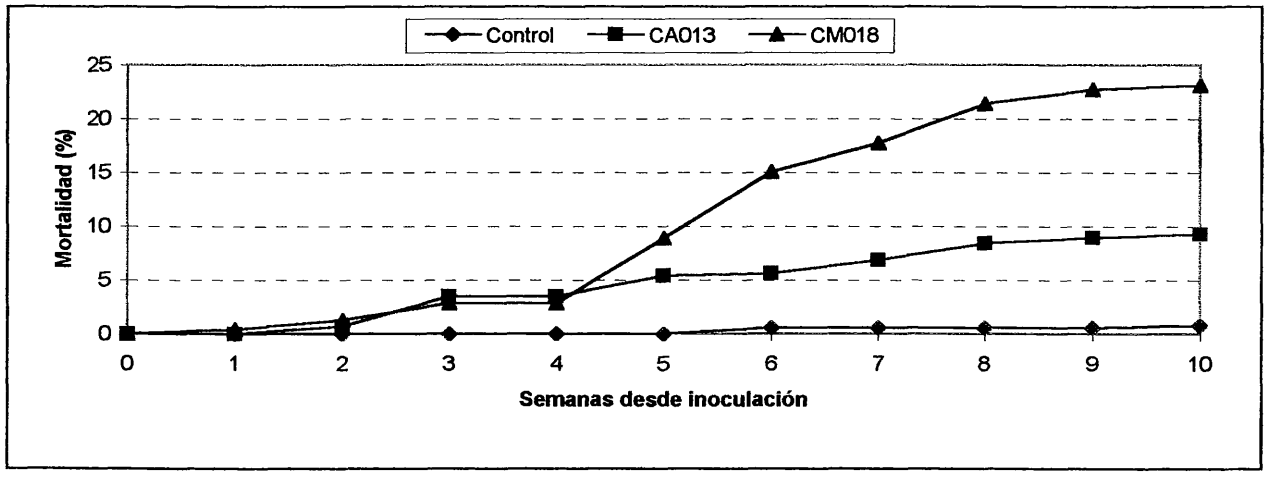


Fig.5,8.- Incidencia de la enfermedad en semillero para la 1ª inoculación. Ensayo de campo en umbráculo.

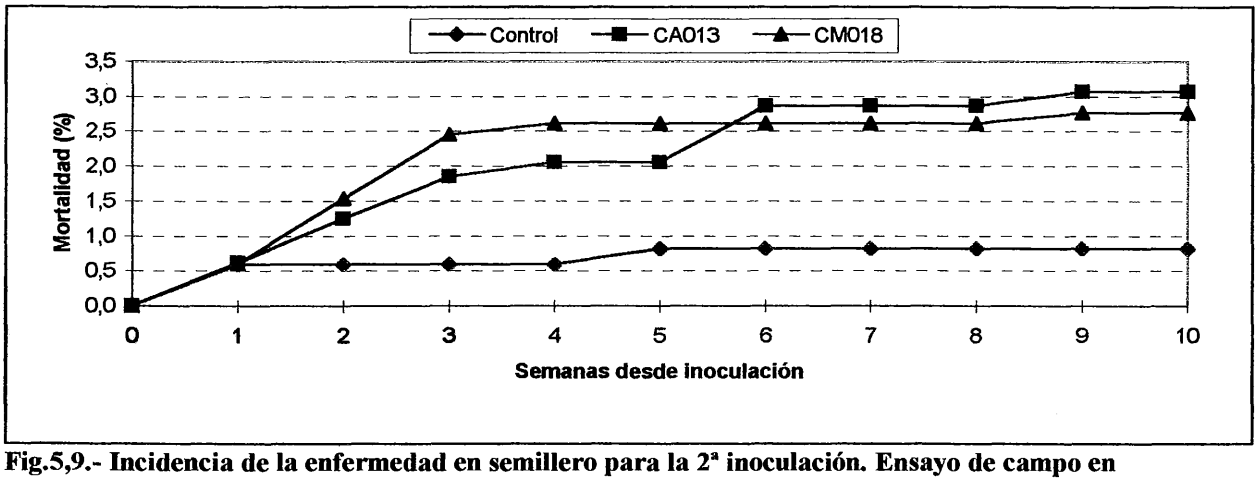


Fig.5,9.- Incidencia de la enfermedad en semillero para la 2ª inoculación. Ensayo de campo en umbráculo.

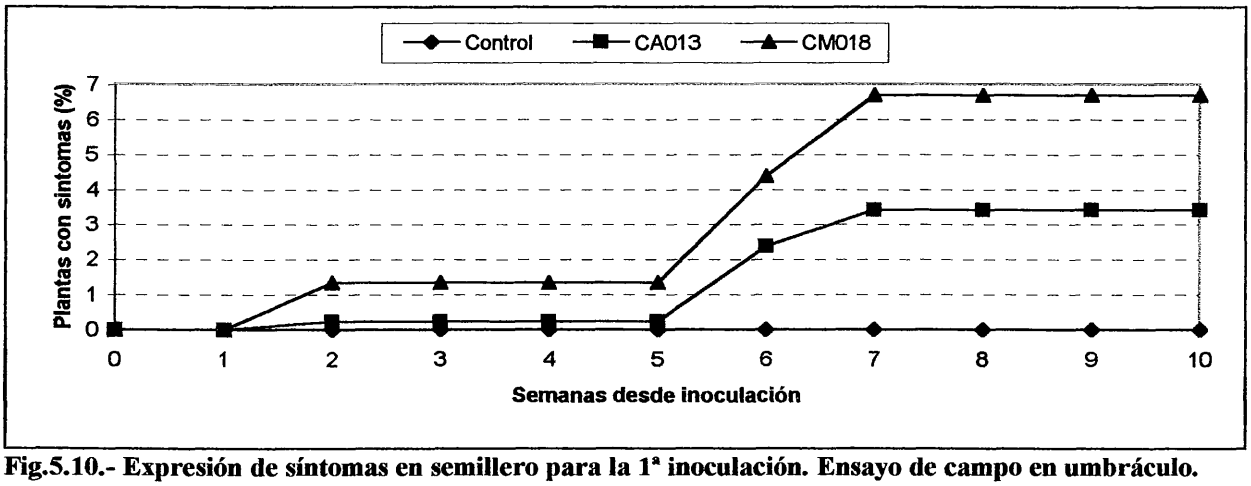


Fig.5.10.- Expresión de síntomas en semillero para la 1ª inoculación. Ensayo de campo en umbráculo.

5.3.2.1.3 Mortalidad para la inoculación-3

Ninguno de los hongos inoculados en el momento del transplante causó la muerte de las plantas.

5.3.2.1.4 Mortalidad para las inoculaciones-4, 5 y 6

Ninguno de los aislados inoculados en los tres momentos durante el segundo año de cultivo de las plantas ha provocado la muerte de las mismas.

5.3.2.1.5 Comparación de las AUDPC

Además del análisis para un tiempo determinado, calculamos el área bajo la curva AUDPC para ambos aislados en cada una de las inoculaciones y las comparamos estadísticamente.

5.3.2.1.5.1 AUDPC para Inoculación-1

El cálculo de las AUDPC para la inoculación-1 cumple las hipótesis previas del ANOVA F si se utilizan los datos transformados. El valor obtenido ($F(2,6)=3,869245$; $p=0,083298$) indica que no existen diferencias entre los tratamientos al nivel de significación del 5% pero con una probabilidad reducida.

En la Tabla 5.17 se recogen las diferencias entre medias y se observa que, mientras que no existen diferencias entre los aislados, sí se aprecian pequeñas diferencias de ambos con el control, aunque solamente al nivel de significación del 1%.

5.3.2.1.5.2 AUDPC para Inoculación-2

Tampoco se detectan diferencias significativas ($p<0,05$) entre los tratamientos, ni entre estos y los controles sanos (ANOVA $F(2,6)= 1,188463$; $p=0,367451$). La Tabla 5.17 recoge los valores de las medias y sus errores típicos.

Tabla 5.17.-Comparación de la variable AUDPC de las inoculaciones 1 y 2 para los valores de mortalidad. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (p< 0,01).

Inóculo	AUDPCmortalidad (%.semana)	
	Inoculación1	Inoculación2
P.irregulare	332,72±34,54 a	147,15±75,76 a
P.intermedium	426,07±278,44 a	154,78±43,97 a
Control	19,39±18,20 b	48,08± 35,64 a

En resumen, no parece haber diferencias significativas entre la mortalidad producida por ambos aislados en la inoculación-2, aunque sigue manteniéndose la diferencia entre la concentración de esporas de los inóculos.

La incidencia de enfermedad para ambos inóculos es la misma durante todo el período considerado (10 semanas).

La mortalidad producida por los tratamientos nunca es significativamente diferente al control sano (Tabla 5.17).

Por otro lado, visualmente observamos un número muy elevado de plantas afectadas en la zona basal y otras que presentan acículas amarillentas y necrosadas especialmente en la última semana (mediados de septiembre) en que la temperatura ambiente bajó hasta los 15-20°C (consultar datos de temperaturas en Anejo 13.2) Esta manifestación de síntomas la estudiamos a continuación en el apartado 5.3.2.2.

5.3.2.2 Incidencia de enfermedad: síntomas

5.3.2.2.1 Síntomas para la Inoculación 1

Al cabo de 10 semanas desde la inoculación las plantas que presentan síntomas evidentes de enfermedad (amarilleamiento de acículas y necrosis parciales de raicillas y cuello) alcanzan el 6,7% para las inoculadas con *P.intermedium* y el 3,5% para las inoculadas con *P.irregulare* (Figura 5.10).

El período en que se observa la aparición de la mayoría de los síntomas coincide en cierta forma con el período de mayor mortalidad, entre la 5ª y la 7ª semanas desde la inoculación, que coincide con mediados del mes de julio. Durante la primera semana no se producen síntomas visibles en las plántulas (Fig.5.10).

El resultado de los análisis ANOVA de los datos sin transformar aplicado para las semanas 5ª, 6ª y 7ª (momentos más representativos según la gráfica) y que se detallan en la Tabla 5.18 y los tests de comparación de medias (Tabla 13.5.3), muestra que si bien no se detectan diferencias en la 5ª semana, en la 6ª comienzan las diferencias claras entre los tratamientos. El tratamiento con el aislado CM018 es diferente del control en la 6ª semana, pero no son significativas el resto de diferencias ($p<0,05$) (Tabla 13.5.3). En la 7ª semana y siguientes se obtiene el mismo resultado con los tres tests (Tabla 13.5.3).

5.3.2.2.2 Síntomas para la Inoculación 2

En la inoculación-2 se alcanzan porcentajes de plantas sintomáticas mucho más elevados: hasta un 32% para *P. irregulare* y más del 10% para *P.intermedium* sobre todo si los comparamos con las mortalidades correspondientes (alrededor del 3% para ambos casos) (Fig. 5.11).

Para *Pythium irregulare* también es entre las semanas 5ª y 6ª (mediados de agosto, en este caso) cuando se produce un aumento en la expresión de síntomas (Fig.5.11), aunque la variabilidad dentro de tratamientos es tan elevada que las diferencias entre tratamientos no son significativas (Tabla 13.5.3). Durante la primera semana se expresan síntomas en un 4-7% de las plantas (Fig.5.11).

En este caso también los datos en porcentaje se transforman del mismo modo, y en los casos en que cumplen las hipótesis previas se estudian mediante ANOVA F; en caso contrario se utiliza Kruskal-Wallis (Tabla 5.18). Se aplican los test de comparación entre tratamientos para las semanas 5ª, 6ª y 10ª por ser las más representativas. En ningún momento se detectan diferencias significativas (Tabla 13.5.4).

Tabla 5.18.-Valores del test ANOVA F de los datos de porcentaje de síntomas para las inoculaciones 1 y 2 con *P.irregulare*, *P.intermedium* y el testigo sano. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05).

Inoculación-1.Síntomas.			Inoculación-2. Síntomas.		
Tiempo	ANOVA		Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(2,6) o H(2,9)	p	(sdi)	F(2,6) o H(2,9)	p
1	------	------	1*	4,581818	0,101200
2*	3,231374	0,198800	2*	4,096968	0,128900
3*	3,231374	0,198800	3*	4,096968	0,128900
4*	3,231374	0,198800	4*	4,096968	0,128900
5*	3,231374	0,198800	5*	4,096968	0,128900
6	7,814313	0,021348	6	1,884911	0,231629
7	8,612130	0,017244	7	1,884911	0,231629
8	8,612130	0,017244	8	1,884911	0,231629
9	8,612130	0,017244	9	1,884911	0,231629
10	8,612130	0,017244	10	1,835975	0,238733

*Como no cumplen las hipótesis previas se recurre al test no-paramétrico de Kruskal-Wallis.

5.3.2.2.3 Síntomas para la Inoculación-3

No se apreciaron síntomas aparentes de enfermedad en las plantas inoculadas en el transplante con ninguno de los inóculos.

5.3.2.2.4 Síntomas para las inoculaciones-4, 5 y 6

Tampoco para las inoculaciones realizadas en el segundo año de cultivo se detectaron síntomas de enfermedad.

5.3.2.2.5 Comparación de las AUDPC

Además del análisis para un tiempo determinado, calculamos el área bajo la curva AUDPC para ambos aislados en cada una de las inoculaciones y las comparamos estadísticamente de igual manera que hicimos para el estudio de las curvas de mortalidad.

5.3.2.2.5.1 AUDPC para Inoculación-1

A pesar de someter los datos a la transformación, no cumplen la condición de homogeneidad de varianzas, por lo que se someten al análisis no paramétrico mediante Kruskal-Wallis (Tabla 5.19). Según dicho test no existen diferencias entre los tratamientos para un nivel de significación del 5%, aunque por un escaso margen (p=0.0775). La comparación de medias realizada aplicando Mann-Whitney detecta diferencias solamente entre el aislado CM018 y el control (p=0.036912) (Tabla 5.19).

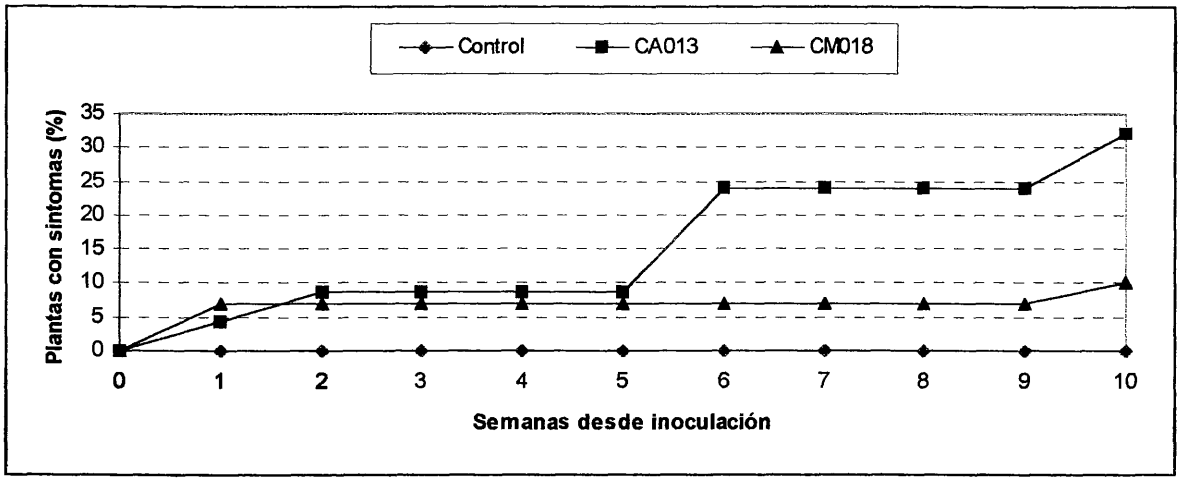


Fig.5.11.- Expresión de síntomas en semillero para la 2ª inoculación. Ensayo de campo en umbráculo.

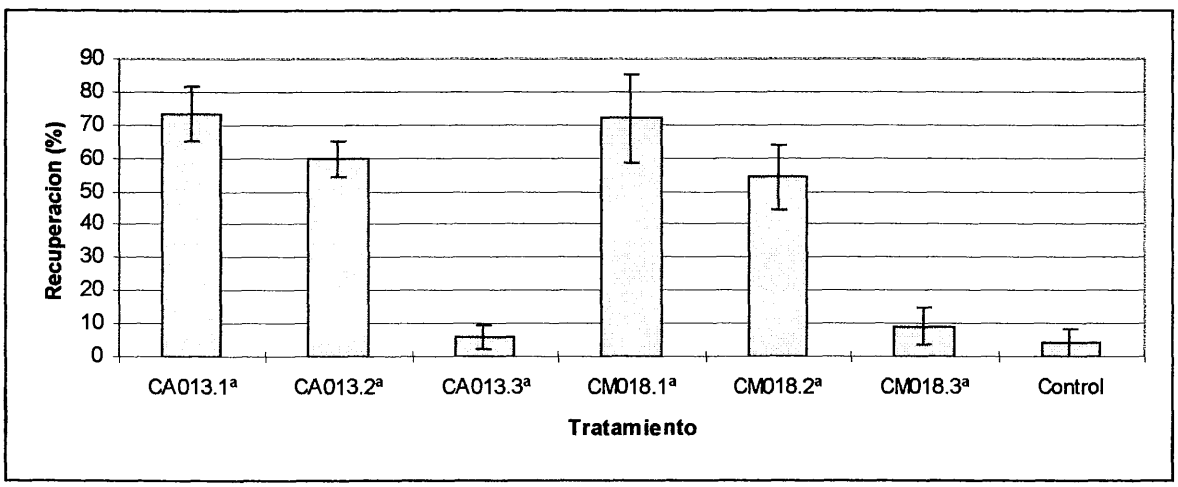


Fig.5.12.- Recuperación de patógeno. Inoculaciones en primer año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

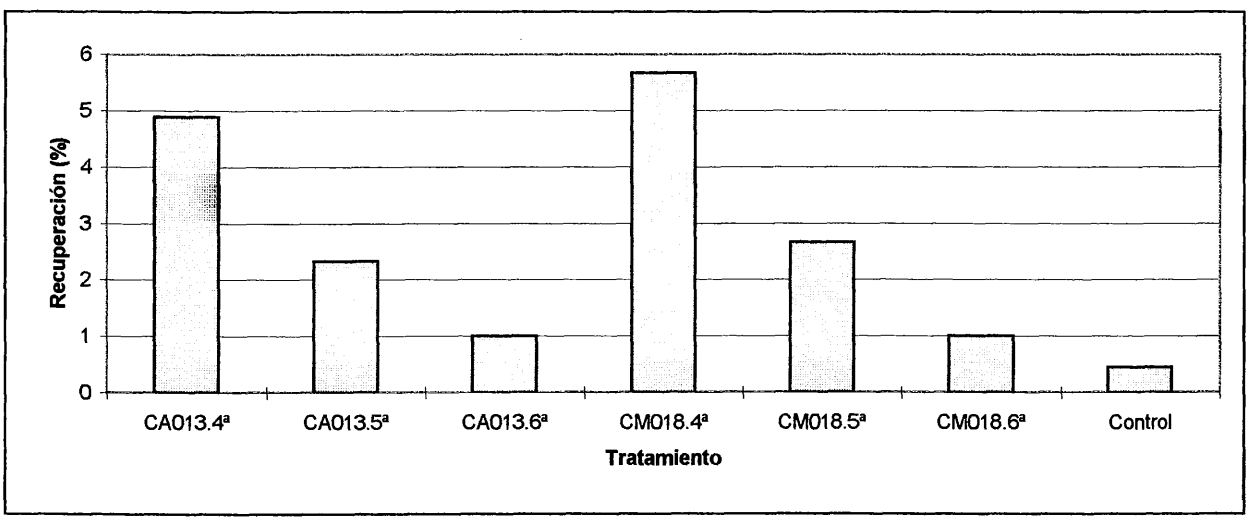


Fig.5.13.- Recuperación de patógeno. Inoculaciones en el segundo año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

5.3.2.2.5.2 AUDPC para Inoculación-2

En este caso los datos transformados si cumplieron las hipótesis a priori por lo que se analizaron mediante el ANOVA F (Tabla 5.19). No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos (p=0.144508). Como ya hemos dicho con anterioridad y seguiremos repitiendo, hay que tener en cuenta que la variabilidad dentro de los grupos fue muy elevada y puede dificultar la detección de diferencias pequeñas.

Tabla 5.19.-Comparación de la variable AUDPC de las inoculaciones 1 y 2 para los valores de aparición de síntomas. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (p< 0,01).

Inóculo	AUDPCsíntomas (%.semana)	
	Inoculación1	Inoculación2
P.irregulare	5,37±2,90 ab	21,49±11,58a
P.intermedium	9,41±1,88 a	18,30±3,80a
Control	0,00±0,00 b	0,00±0,00a

5.3.2.3 Recuperación de patógeno

5.3.2.3.1 Inoculaciones 1, 2 y 3

De los datos de recuperación de patógeno para las plantas supervivientes a las inoculaciones al finalizar el ensayo en primavera (Figura 5.12 y Tabla 5.20) se recogen las siguientes observaciones:

1.- Las plantas conservan el inóculo en su interior en niveles elevados (de más del 70% para la inoculación-1 y del 55-60% para la inoculación-2) al cabo de aproximadamente un año desde su inoculación y en las condiciones de cultivo normal en vivero.
2.- Al finalizar el ensayo, en la primavera del año siguiente, se recupera el hongo de las plantas inoculadas en el transplante (inoculación-3) en menos de un 10% de las raíces analizadas.

Los datos de porcentaje de recuperación de patógeno en las plantas supervivientes no se ajustan a la distribución normal ni cumplen la hipótesis de homogeneidad de varianzas, ni siquiera después de la transformación, por lo que se recurre a su estudio mediante la estadística no paramétrica.

Se pusieron de manifiesto las correlaciones entre variables calculando los coeficientes de correlación de Spearman (Tabla 5.21), de donde se llegó a la conclusión de que existe una fuerte correlación entre el momento de la inoculación y la recuperación de patógeno. Por el contrario no se ha encontrado ninguna correlación entre el aislado y la recuperación de patógeno.

Los análisis de varianza realizados según el test de rangos de Kruskal-Wallis y el test de la Mediana confirman las hipótesis de que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los dos inóculos [H(1,55)=0,0188855; p=0,8907 y X^2(1)=0,0218254; p=0,8826 respectivamente]. y, sin embargo, si existen diferencias acusadas entre las inoculaciones [H(2,N=55)=16,97642; p=0,0002 y X^2(2)=13,22612; p=0,0013 respectivamente].

El test U de comparación de rangos de Mann-Whitney aplicado a los pares de medias detecta diferencias significativas para las inoculaciones 1 y 2 con respecto a la inoculación-3 (p=0,000012 y p=0,002975 respectivamente) y ninguna diferencia entre ellas (p=0,299406) (Tabla 5.20).

Por otro lado, las comparaciones entre los tratamientos y los controles aparecen como significativas cuando comparamos las inoculaciones 1 y 2 con los controles y no significativas cuando comparamos la inoculación-3 con los controles (Tabla 5.20), aunque hay que tener en cuenta que el micelio aislado en los controles no se correspondía con ninguno de los hongos inoculados. De cada tratamiento se reaisló el hongo que había sido inoculado.

Tabla 5.20.-Efecto de la inoculación sobre la recuperación de patógeno para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p< 0,05) según ANOVA Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney. *El hongo recuperado del control no pertenecía al género *Pythium*.

Inóculo	Recuperación de patógeno (%)		
	Inoculación-1	Inoculación-2	Inoculación-3
P.irregulare	73,40±8,52 a	59,82±5,43 a	5,72±3,50 b
P.intermedium	71,97±13,34 a	54,18±9,62 a	9,09±5,75 b
Control		4,25±4,07 b*	

Tabla 5.21.-Efecto del hongo y de la inoculación sobre la recuperación de patógeno al final del ensayo para las inoculaciones 1, 2 y 3. Valores del Test de Rangos de Spearman.

Factor	Variable dependiente: Recuperación de patógeno		
	Spearman R	t(N-2)=t(53)	p
Hongo	-0,018697	-0,136141	0,892226
Inoculación	-0,502156	-4,22739	0,000094*

5.3.2.3.2 Inoculaciones 4, 5 y 6

Los porcentajes de recuperación del patógeno al final del ensayo de inoculaciones en el segundo año de cultivo (Fig.5.13) siguen la misma tendencia que los obtenidos con las inoculaciones realizadas en el primer año; van disminuyendo a medida que aumenta la edad de la planta en el momento de la inoculación. Los valores medios (15 repeticiones para los controles y el tratamiento con CA013 en la inoculación-4 y 10 repeticiones para los demás tratamientos) recogidos en la Tabla 5.22, se sitúan alrededor del 5% para la inoculación-4 , el 2,5% para la inoculación-5 y el 1% para la inoculación-6, en general muy inferiores a los registrados en las inoculaciones en primer año.

Como los datos no cumplen la condición de normalidad, ni siquiera después de someterlos a la transformación, se analizan mediante la estadística no-paramétrica.

Tabla 5.22.-Efecto de la inoculación sobre la recuperación de patógeno para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes ($p< 0,05$) según ANOVA Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney. *El hongo recuperado del control no se correspondía con ninguno de los hongos inoculados.

Inóculo	Recuperación de patógeno (%)		
	Inoculación-4	Inoculación-5	Inoculación-6
P.irregulare	4,89±2,70 a	2,33±1,29 ab	1,00±0,74 bc
P.intermedium	5,66±1,90 a	2,67±1,30 ab	1,00±0,74 bc
Control		0,44±0,41 c*	

La correlación entre variables, medida a partir de los valores del coeficiente de Spearman (Tabla 5.23) indican que, al igual que ocurrió en el ensayo en primer año de cultivo, no existe correlación entre el aislado inoculado y su recuperación, mientras que si existe correlación entre el momento de inoculación y la recuperación del hongo al final del ensayo.

Según el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (Tabla 5.24 y Tabla 5.22) se confirma lo anterior; al nivel de significación del 5%, no existen diferencias entre ambos inóculos en ninguna de las inoculaciones. Por contra, la inoculación-4 se diferencia de la inoculación-6 y del control aunque no es diferente de la inoculación-5. La inoculación-5 no se diferencia de ninguna de las otras. En la Tabla 13.5.5, al estudiar detenidamente los valores del nivel de significación "p" obtenidos al aplicar el test U de Mann-Whitney, se puede comprobar que en algunos casos la consideración de diferentes, o iguales, es muy discutible ya que se sitúan muy próximos al valor p=0,05. Este es el caso de la comparación entre la inoculación-4 y la inoculación-5, y de CA013 en la inoculación-4 comparado con ambos aislados en la inoculación-6.

Tampoco aquí el escaso micelio aislado de los controles se identifica como ninguna de las especies inoculadas.

Tabla 5.23.-Efecto del hongo y de la inoculación sobre la recuperación de patógeno al final del ensayo para las inoculaciones 4, 5 y 6. Valores del Test de Rangos de Spearman.

Factor	Variable dependiente: Recuperación de patógeno		
	Spearman R	t(N-2)=t(53)	p
Hongo	0,054789	0,43553	0,664667
Inoculación	-0,440964	-3,89966	0,00024*

Tabla 5.24.-Efecto del hongo y de la inoculación sobre la recuperación de patógeno al final del ensayo para las inoculaciones 4, 5 y 6. Valores del estadístico H del Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis. Los valores marcados con asterisco "*" revelan diferencias significativas entre los tratamientos. El factor "tratamiento" evalúa tanto los efectos del aislado inoculado (hongo) como del momento de la inoculación (inoculación) e incluye los datos de los controles.

Factor	Variable dependiente: Recuperación de patógeno (%)	
	H	p
Hongo	H(1,65)= 0,192123	0,6612
Inoculación	H(2,65)=12,44513	0,0020*
Tratamiento	H(6,80)= 21,96299	0,0012*

5.3.2.4 Efectos sobre los parámetros de crecimiento

5.3.2.4.1 Inoculaciones de primer año

5.3.2.4.1.1 Medidas de longitud de raíz principal y tallo de plantas supervivientes y asintomáticas en el momento del transplante (solo para las inoculaciones 1 y 2).

Las plantas se recogieron para su análisis a las 24 y 19 semanas de la inoculación-1 ó 2 correspondiente. Los datos se exponen gráficamente en la Figura 5.14.

Las variables se evalúan mediante estadística no paramétrica ya que no cumplen ninguna de las hipótesis previas y, además, al construir las gráficas de medias/desviaciones típicas y calcular los coeficientes de correlación encontramos una elevada correlación (r=0,65378 para la variable "longitud de raíz" y r=0,95545 para la variable "longitud de raíz"). El tamaño de muestra empleado fue de 90 para todos los tratamientos con excepción de la inoculación-1 con CA013 en el que contamos con 86 datos.

Tanto según el test de Kruskal-Wallis como según el test de la Mediana existen diferencias significativas entre los tratamientos para ambas variables: longitud de raíz principal y longitud de tallo (Tabla 5.25). Las medias de los tratamientos, sus errores típicos y su comparación estadística utilizando el test U de Mann-Whitney, se detallan en la Tabla 5.25.

Tabla 5.25.-Efecto de la inoculación sobre las longitudes de raíz principal y tallo de las plantas asintomáticas en el momento del transplante para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según ANOVA Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney.

Inóculo	Longitud de raíz principal (cm.)		Longitud de tallo (cm.)	
	Inoculación-1	Inoculación-2	Inoculación-1	Inoculación-2
P.irregulare	14,14±0,96 b	13,97±0,71 b	5,55±0,23 b	6,19±0,27 a
P.intermedium	15,36±0,72 b	18,04±1,02 a	4,96±0,18 c	6,00±0,27 a
Control	18,29±0,95 a		5,96±0,29 a	

En general, la longitud de la raíz principal se ha visto significativamente reducida para ambos patógenos en las inoculaciones 1 y 2, con excepción de la inoculación-2 con CM018 en la que no hay diferencias con el control sano (Tabla 5.25). En cuanto a longitud de tallo, hay diferencias significativas en todos los casos para la inoculación-1, pero no para la inoculación-2, independientemente del hongo inoculado (Tabla 5.25).

En conclusión, los datos parecen indicar que, aparte de la mortalidad, otro efecto de la presencia del patógeno es la reducción en el crecimiento de la raíz principal y del tallo en la inoculación-1. Los efectos de la inoculación-2 no son tan evidentes, parece no tener efecto sobre el crecimiento en longitud del tallo, mientras que la longitud de raíz se vio muy influida por el hongo inoculado (reducida para la inoculación con CA013 pero no con CM018) (Tabla 5.25).

Este es un efecto a tener en cuenta porque da idea de que las plantas supervivientes y aparentemente sanas han sufrido también el efecto del patógeno, que en un porcentaje elevado también llevan en la raíz.

5.3.2.4.1.2 Medidas de longitud de raíz principal y tallo de las plantas supervivientes y asintomáticas al final del ensayo (1 año desde la siembra) para los tres momentos de inoculación.

Los valores obtenidos se presentan en la Figura 5.15.

Las variables se estudian mediante métodos no paramétricos ya que no se cumple la hipótesis previa de normalidad de los residuos. El tamaño de muestra es de 30 plantas por tratamiento.

Al aplicar tanto el test de Kruskal-Wallis como el de la Mediana se obtiene el mismo resultado, por el que se detectan diferencias significativas entre todos los tratamientos (p=0,0015 y p=0,0115 respectivamente) para la variable longitud de tallo, mientras que no se detectan para la longitud de la raíz principal (p=1,000 y p=0,3708 respectivamente).

Las comparaciones de medias (Tabla 5.26) para la variable "longitud de tallo" mediante el test U de Mann-Whitney denotan diferencias significativas al 5% solo cuando confrontamos las medias de la inoculación-3 para ambos inóculos y el testigo sano y las otras dos inoculaciones con CA013. Por otra parte, la inoculación-2 con CA013 es significativamente diferente a todas las inoculaciones con CM018 y a la inoculación-3 con CA013 (Tabla 5.26). Todas las demás comparaciones no son significativas (Tabla 5.26).

5.3.2.4.1.3 Estudio de las interacciones

Al considerar conjuntamente el efecto del aislado inoculado y el momento de inoculación, mediante los correspondientes análisis de varianza ANOVA F para ambas variables dependientes (Tablas 5.27 y 13.5.6), encontramos que existe interacción para la variable "longitud de raíz". Por el contrario, no se detectan interacciones para la variable "longitud de tallo". El efecto principal para esta variable es el momento de inoculación.

A la vista de estos datos se procede a la comparación de medias para este efecto (Tabla 13.5.7) resultando que la inoculación-3 se diferencia significativamente de las otras dos al aplicar cualquiera de los tres tests (LSD, Duncan y Scheffé). No hay diferencias entre las inoculaciones 1 y 2 (Tabla 13.5.7).

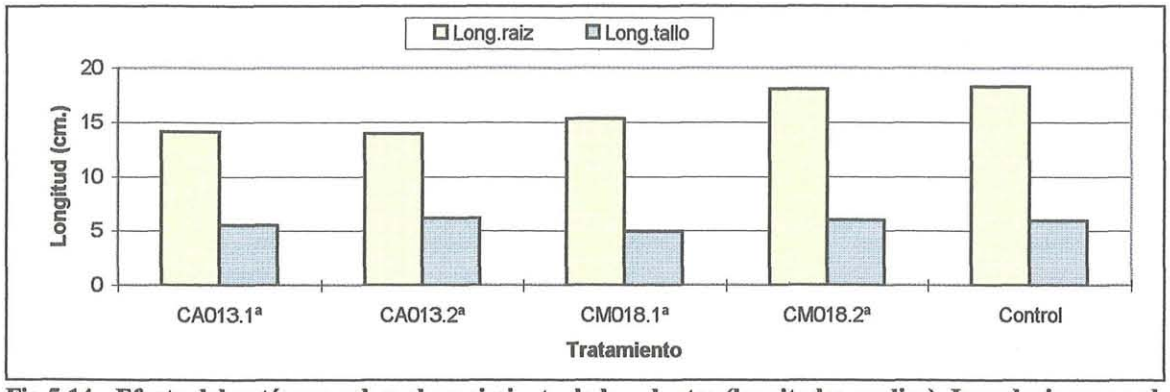


Fig.5.14.- Efecto del patógeno sobre el crecimiento de las plantas (longitudes medias). Inoculaciones en el primer año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

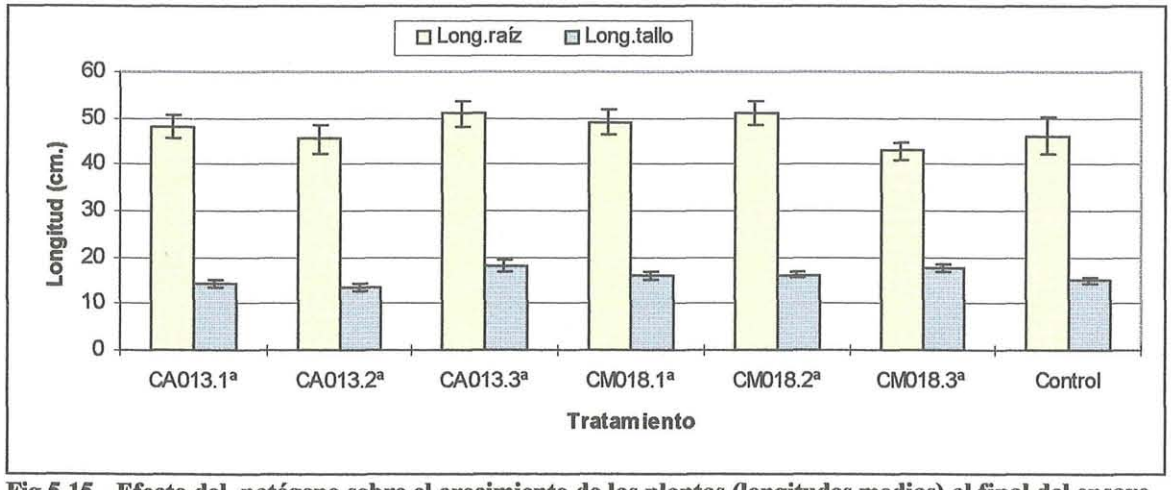


Fig.5.15.- Efecto del patógeno sobre el crecimiento de las plantas (longitudes medias) al final del ensayo. Inoculaciones en el primer año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

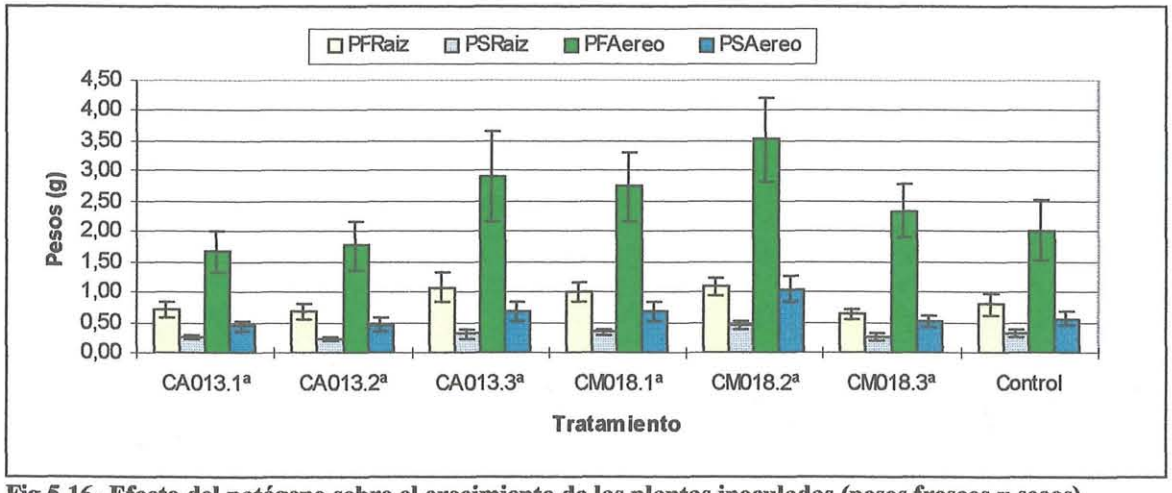


Fig.5.16- Efecto del patógeno sobre el crecimiento de las plantas inoculadas (pesos frescos y secos) al final del ensayo. Inoculaciones en el primer año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

Tabla 5.26.-Efecto de la inoculación sobre las longitudes de raíz principal y tallo de las plantas asintomáticas al final del ensayo (1 año desde la siembra) para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según ANOVA Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney.

Inóculo	Longitud de raíz principal (cm.)			Longitud de tallo (cm.)		
	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3
P.irregulare	48,05±2,57 a	45,52±3,17 ab	51,02±2,71 a	14,50±0,84 bc	13,62±0,84 c	18,18±1,09 a
P.intermedium	49,18±2,75 a	51,11±2,54 a	42,97±1,84 b	16,17±0,89 ab	16,25±0,78 ab	17,71±0,90 a
Control		46,18±3,99 ab			15,11±0,65 bc	

Tabla 5.27.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Hongo	0,0424	0,8372	3,1948	0,0756
Inoculación	0,2133	0,8081	6,9060	0,0013*
Interacción	3,4533	0,0338*	1,4825	0,2299

La variable "longitud de raíz" ha de analizarse caso por caso al existir interacciones significativas (Tabla 5.27). El resultado de la comparación múltiple de medias es que no se detectan diferencias (p<0,05) en ningún caso al aplicar los tests de Duncan y Scheffé (Tabla 5.26). LSD detecta diferencias (p<0,05) solo entre la inoculación-3 con CM018 y la inoculación-3 con CA013 (p=0,033471) y con la inoculación-2 con CM018 (p=0,031430) (Tabla 5.26).

En resumen, en cuanto a longitud de raíz principal no hay diferencias significativas para ninguno de los inóculos y ninguna de las inoculaciones. Parece que los efectos del patógeno se disipan con el tiempo. Las plantas normalizan su crecimiento al final del primer año de cultivo normal en vivero si no se producen nuevas inoculaciones.

Parecen tener un desarrollo mayor del tallo las inoculaciones en el momento del transplante para ambos inóculos (inoculación-3) frente a las inoculaciones en los dos momentos anteriores. Parece que el hongo aplicado en ese momento incluso ha favorecido en cierta medida el crecimiento de la parte aérea de las plantas.

No hay ningún efecto negativo del inóculo sobre las plantas al cabo del primer año de cultivo

5.3.2.4.1.4 Pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes y asintomáticas al final del ensayo (1 año desde la siembra).

La representación gráfica de las cuatro variables se encuentra en la Figura 5.16.

Los datos de pesos también se analizan mediante métodos no paramétricos puesto que se ha comprobado que existe correlación entre las medias y las varianzas.

Coeficientes de correlación :

Peso fresco de raíz, r= 0,79323
Peso fresco de parte aérea, r= 0,89650
Peso seco de raíz, r=0,72544
Peso seco de parte aérea, r= 0,88143

La aplicación de los tests de Kruskal-Wallis y de la Mediana reconoce la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos para todas las variables al nivel de significación del 5% (Tablas 5.28 y 5.29).

Lo más destacado de las comparaciones dos a dos mediante el test U de Mann-Whitney es que la inoculación-2 con el aislado CM018 presenta para las cuatro variables el mismo comportamiento: presenta un valor mayor que los controles para las variables de desarrollo de parte aérea (pesos frescos y secos) y también mayor que las inoculaciones 1 y 2 con CA013 tanto para el sistema radicular como para la parte aérea (Tablas 5.28 y 5.29). Las diferencias son estadísticamente significativas en los casos citados, al nivel de significación del 5%.

En todas las demás comparaciones de los tratamientos con los controles sanos no hubo diferencias significativas (Tablas 5.28 y 5.29).

El estudio de las interacciones entre las variables "hongo inoculado" y "momento de inoculación" señala su existencia para las cuatro variables y, por tanto, deben estudiarse todos los casos individualmente (Tabla 5.30).

Tabla 5.28.-Efecto de la inoculación sobre los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de las plantas asintomáticas al final del ensayo (1 año desde la siembra) para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según el test de Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney.

Inóculo	Peso fresco de raíz (g.)			Peso fresco de parte aérea (g.)		
	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3
P.irregulare	0,717±0,118 bc	0,680±0,129 bc	1,078±0,242 a	1,677±0,339 c	1,765±0,391 bc	2,705±0,744 ab
P.intermedium	1,007±0,168 ab	1,090±0,152 a	0,635±0,086 c	2,473±0,561 ab	3,513±0,684 a	2,260±0,426 bc
Control		0,781±0,162 abc			2,000± 0,499 bc	

Tabla 5.29.-Efecto de la inoculación sobre los pesos secos de sistema radicular y parte aérea de las plantas asintomáticas al final del ensayo (1 año desde la siembra) para cada inóculo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p< 0,05) según el test de Kruskal-Wallis seguido por el test U de Mann-Whitney.

Inóculo	Peso seco de raíz (g.)			Peso seco de parte aérea (g.)		
	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3
P.irregulare	0,261±0,041 bc	0,229±0,041 c	0,312±0,070abc	0,445±0,088 b	0,468±0,100 b	0,681±0,166 ab
P.intermedium	0,346±0,057 ab	0,450±0,066 a	0,263±0,053 bc	0,692±0,161 ab	1,046±0,202 a	0,520±0,085 b
Control		0,323±0,068 abc			0,556±0,123 b	

Tabla 5.30.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	0,864919	0,353922	4,851985	0,029204*
Inoculación	0,035535	0,965098	1,265924	0,285097
Interacción	7,504272	0,000794*	3,611284	0,029492*

Factor	Variable dependiente			
	Peso seco raíz		Peso seco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	6,407665	0,012437*	6,267678	0,013412*
Inoculación	0,772349	0,463831	1,811612	0,167094
Interacción	4,798165	0,009609*	5,291656	0,006059*

Si contrastamos los resultados obtenidos de las variables de peso con las de longitud (evaluadas en el apartado anterior) perdemos el efecto de estímulo del crecimiento en longitud del tallo en la inoculación-3, mientras que detectamos un cierto aumento de peso en las plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-2. Las diferencias podrían explicarse debido a que las longitudes representan solo el alargamiento de la planta, mientras que los pesos dan idea del desarrollo global de toda la parte aérea y de todo el sistema radicular.

5.3.2.4.1.5 Curvas de crecimiento en altura.

Se calculó la media de la altura semanal para los tres bloques en los que se han agrupado las plantas de cada tratamiento, en total 3 bloques de 35 plantas cada uno (105 plantas en total) en las inoculaciones-3 y el control y otros 3 bloques de 11 plantas (33 plantas en total) en las inoculaciones 1 y 2 para cada semana.

Con estos datos de altura de plantas semanal, tomados a lo largo de 21 semanas, comenzando en el transplante y continuando durante el otoño posterior y la primavera del año siguiente, dibujamos las curvas de crecimiento (Figura 5.17) con el objeto de comprobar si existía alguna influencia del inóculo o del momento de inoculación sobre el crecimiento posterior de las plantas supervivientes y aparentemente asintomáticas.

Dichas curvas de crecimiento del huésped fueron estudiadas mediante dos procedimientos. El primero consistió en calcular el área bajo la curva de crecimiento para las tres repeticiones, por un procedimiento semejante al empleado para el cálculo de AUDPC (consultar apartado 3.2.6.4), y dicha variable se comparó mediante análisis de varianza ANOVA F, previa comprobación de las hipótesis de normalidad y homoscedasticidad. Por el segundo procedimiento se comprobó el ajuste de las curvas a rectas de regresión y se compararon los parámetros de la regresión según el método de los intervalos de confianza explicado con anterioridad en 3.2.6.5.

5.3.2.4.1.5.1 Área bajo la curva de crecimiento

En todos los casos se cumplen dichas hipótesis previas, por lo que los datos se analizan mediante tests paramétricos.

En conjunto para todas las semanas (Tabla 5.31) ANOVA F no detecta diferencias significativas. Sin embargo, el test LSD al 5% detecta diferencias solo entre las inoculaciones 2 y 3 con el aislado CA013. Ni el test de Duncan, ni el de Scheffé, este último más estricto para aceptar la hipótesis alternativa, señalan ninguna diferencia entre las medias. Hay que destacar que la varianza dentro de los grupos es muy elevada por lo que es altamente difícil que se puedan detectar pequeñas diferencias entre los grupos.

Tabla 5.31.-Comparación de la variable "Area bajo la curva de crecimiento" estándar para los inóculos CA013 y CM018 y los tres momentos de inoculación considerando todo el período de crecimiento (desde el transplante en noviembre hasta el verano del año siguiente). Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes según LSD (p< 0,05).

Inóculo	Área bajo la curva de crecimiento estándar (cm×semana)		
	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3
P.irregulare	5.393±0,635 ab	4,761±0,422 b	6,056±0.175 a
P.intermedium	5,506±0,324 ab	5,864±0,380 ab	5,888±0.343 ab
Control		5,361±0,488 ab	

Si estudiamos por separado el comportamiento de las plantas durante los períodos de otoño y primavera (Tablas 5.32 y 5.33), obtenemos que:

a)en el período de **otoño** posterior al trasplante se detectan diferencias significativas en altura de planta con LSD al 5% solamente en dos casos: entre las plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-2 y las inoculadas con CM018 en inoculación-3, y también entre estas últimas y las inoculadas en inoculación-1 con el mismo hongo, con niveles de significación de p=0.0391 y de p=0.0195 respectivamente (Tabla 5.32). Sin embargo, tanto Duncan como Scheffé no detectan ninguna diferencia. El coeficiente de correlación entre las medias y las desviaciones típicas confirma la ausencia de correlación (r = -0.1186) (Tabla 5.32).

b)en el período de **primavera**, una vez pasado el invierno durante el cual las plantas no han crecido, de nuevo LSD detecta ligeras diferencias entre los tratamientos con CA013 en las inoculaciones 2 y 3 (p=0.0425) (Tabla 5.33). Las plantas inoculadas en el transplante (inoculación-3) han alcanzado una altura mayor frente a las de la inoculación-2 que han mostrado los valores menores para dicho parámetro. En este caso Duncan y Scheffé tampoco recogen diferencias (Tabla 5.33). El coeficiente de correlación entre las medias y las desviaciones típicas es un poco elevado (r=-0.7386) por lo que puede ser necesario realizar un cambio de variable o recurrir a la estadística no paramétrica.

Tabla 5.32.-Comparación de la variable "Area bajo la curva de crecimiento" estándar para los inóculos CA013 y CM018 y los tres momentos de inoculación considerando solo el período de crecimiento del otoño. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes según LSD (p< 0,05).

Inóculo	Área bajo la curva de crecimiento (cm×semana)		
	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3
P.irregulare	3,156±0,455 ab	2,650±0,347 b	3,174±0,161 ab
P.intermedium	2,505±0,246 b	3,021±0,188 ab	3,561±0,253 a
Control		3,201±0,218 ab	

Tabla 5.33.-Comparación de la variable "Area bajo la curva de crecimiento" estándar para los inóculos CA013 y CM018 y los tres momentos de inoculación considerando solo el período de crecimiento de la primavera. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes según LSD (p< 0,05).

Inóculo	Área bajo la curva de crecimiento (cm×semana)		
	Inoculación1	Inoculación2	Inoculación3
P.irregulare	3,997±0,443 ab	3,586±0,368 b	4,659±0,194 a
P.intermedium	4,397±0,239 ab	4,541±0,308 ab	4,329±0,351 ab
Control		3,964±0,404 ab	

Como hemos repetido en los puntos anteriores también aquí es marcado el efecto de la gran variabilidad dentro de los grupos que pudiera enmascarar pequeñas diferencias entre los grupos.

En ningún momento aparecen diferencias significativas de los tratamientos con el testigo (Tablas 5.31 y 5.32), por lo que la conclusión general es que ni el hongo inoculado, ni el momento de inoculación de los ensayados han reducido el crecimiento en altura de las plantas supervivientes después del transplante y durante el primer año de cultivo normal en vivero para las condiciones climáticas del año. Al contrario, parece que se ha producido un cierto estímulo en el crecimiento en altura para las inoculaciones efectuadas en el transplante aunque, a la vista de los resultados, no podemos afirmarlo. Sin embargo, es un fenómeno conocido en Patología que ocurre con otros hongos fitopatógenos (carbones y tizones en cereal), los cuales estimulan el crecimiento del huésped antes de matarlo.

5.3.2.4.1.5.2 Regresión lineal

Para la comprobación del ajuste a rectas de regresión también se consideran los dos períodos de crecimiento por separado: otoño y primavera.

Ya de la gráfica (Fig.5.17) se deduce claramente que no ha habido crecimientos en altura apreciables durante el período de otoño posterior al transplante, por lo que parece que los datos pueden ajustarse a rectas horizontales, siguiendo por tanto un modelo con pendiente cero (hipótesis nula del ANOVA F H_0, cierta), y que las posibles diferencias entre tratamientos solo pueden registrarse en los valores de la ordenada en el origen. Por el contrario, es en la primavera del año siguiente cuando, lógicamente, las plantas comienzan a crecer y las curvas muestran una tendencia al ajuste a rectas con pendiente distinta de cero (hipótesis alternativa H_1 cierta) y la comparación entre tratamientos se realiza atendiendo a dicho parámetro.

En el ANEJO 13.5 (Tablas de 13.5.8 a 13.5.31) se resumen los resultados estadísticos de la regresión lineal para todos los tratamientos, tanto para el período de otoño como para el de primavera. Según estos datos se confirma lo anticipado por la gráfica (Fig.5.17). Los datos de altura de plantas durante el otoño se ajustan a rectas horizontales $y = y_0$ mientras que los de primavera se ajustan al modelo $y = mX + y_0$, con pendiente m y ordenada en origen y_0 (Tablas 5.34 y 5.35).

Tabla 5.34.-Resúmen de la estadística de las regresiones lineales para los datos de altura de plantas en las inoculaciones 1, 2 y 3 para el período de otoño. Valores de R^2 y R^2a en porcentaje.

Hongo	Inoculación	R^2	R^2a	MSE	F	p
CA013	1	7,5	3,3	1,07128	1,7821	0,1955
CA013	2	8,9	4,8	0,76151	2,1572	0,1561
CA013	3	34,1	31,4	1,19072	12,921	0,0014
CM018	1	1,6	-2,9	0,05650	0,3551	0,5573
CM018	2	7,5	3,3	0,16431	1,7836	0,1954
CM018	3	15,9	12,6	0,76645	4,7429	0,0391
Control	-	2,4	-1,4	0,07711	0,6312	0,4344

Tabla 5.35.-Resúmen de la estadística de las regresiones lineales para los datos de altura de plantas en las inoculaciones 1, 2 y 3 para el período de primavera. Valores de R^2 y R^2a en porcentaje.

Hongo	Inoculación	R^2	R^2a	MSE	F	p
CA013	1	57,0	55,8	72,837	49,036	0,0000
CA013	2	64,5	63,5	70,085	67,252	0,0000
CA013	3	94,1	93,9	251,74	591,19	0,0000
CM018	1	90,0	89,7	221,70	333,66	0,0000
CM018	2	91,2	90,9	296,22	382,72	0,0000
CM018	3	76,8	76,2	144,93	122,75	0,0000
Control	-	72,3	71,5	129,52	96,531	0,0000

Los parámetros de la regresión se comparan mediante el cálculo de los intervalos de confianza (apartado 3.2.6.5.1).

El resultado obtenido es que, para el período de otoño, hay diferencias significativas para un nivel de significación del 5% entre ambos inóculos en las inoculaciones 1 y 2, aunque no las hay en la inoculación-3 (Tabla 5.36). Por otro lado, en las comparaciones de ambos hongos con el control hay diferencias en todos los casos con excepción de la inoculación-2 con CA013 y la inoculación-1 con CM018, que parece ser el tratamiento que presenta una altura media menor (Fig.5.17). Podría pensarse entonces que los grupos de plantas que durante esta etapa han alcanzado una altura menor han de ser necesariamente las que mantengan un crecimiento menor durante la primavera del año siguiente. No obstante, no son necesariamente las plantas con menor altura durante el otoño las que alcanzaron menor crecimiento en primavera (Fig.5.17). Por ejemplo, si nos fijamos en los tratamientos CA013.1ª (inoculación-1 con CA013) y CM018.1ª (inoculación-1 con CM018) vemos que las plantas de menor talla corresponden a las inoculadas con CM018 (recordemos que fue el aislado más virulento), pero que, al final del período considerado de la primavera, superan en aproximadamente 2 cm. el crecimiento medio de las otras (Fig.5.17).

En el período de primavera no hay diferencias significativas entre los dos hongos para ninguno de los momentos de inoculación (Tabla 5.37). El control es distinto a CA013 para las inoculaciones 1 y 2 (estas han sido las plantas que presentan menor crecimiento), y es distinto a CM018 para la inoculación-3 (Tabla 5.37).

Tabla 5.36.-Valores del intervalo de confianza para la comparación de la ordenada en el origen de las rectas de regresión del crecimiento en altura para las inoculaciones 1, 2 y 3 durante el período de otoño.

	Intervalos de confianza		
	Inoculación-1	Inoculación-2	Inoculación-3
CA013-CM018	1,179053825	0,031542348	-0,090154055
	-0,400893825	-1,177442348	-0,808025945
CA013-Control	0,579924299	-0,046478278	0,042888867
	-0,907484299	-1,230441722	-0,616848867
CM018-Control	-0,114630118	0,305076244	0,541682891
	-0,991089882	-0,436096244	-0,217462891

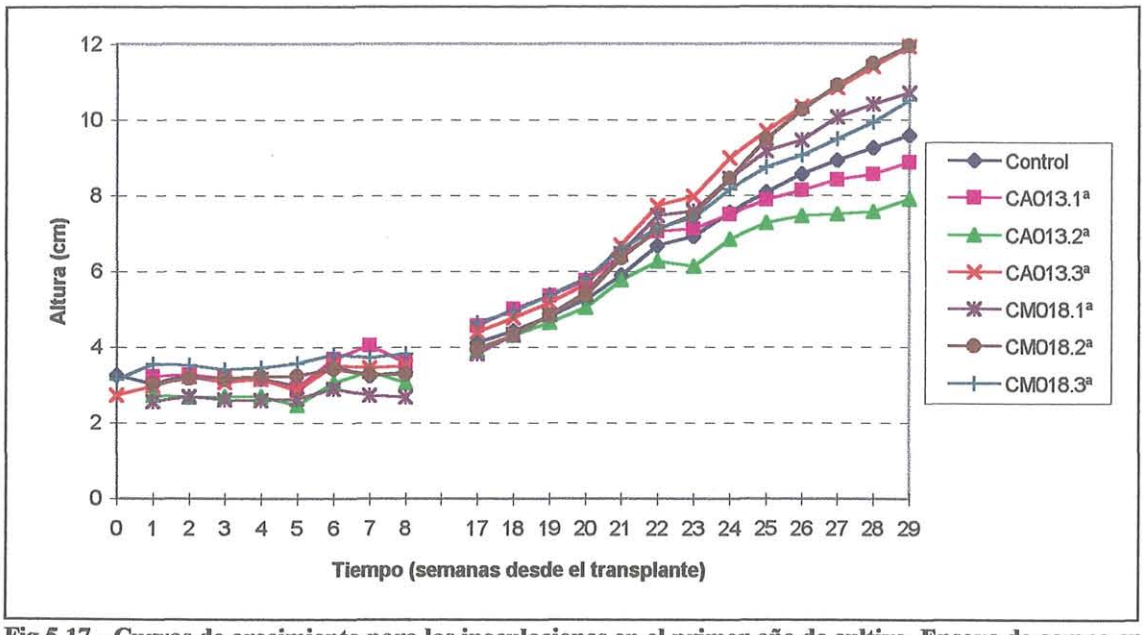


Fig.5.17.- Curvas de crecimiento para las inoculaciones en el primer año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

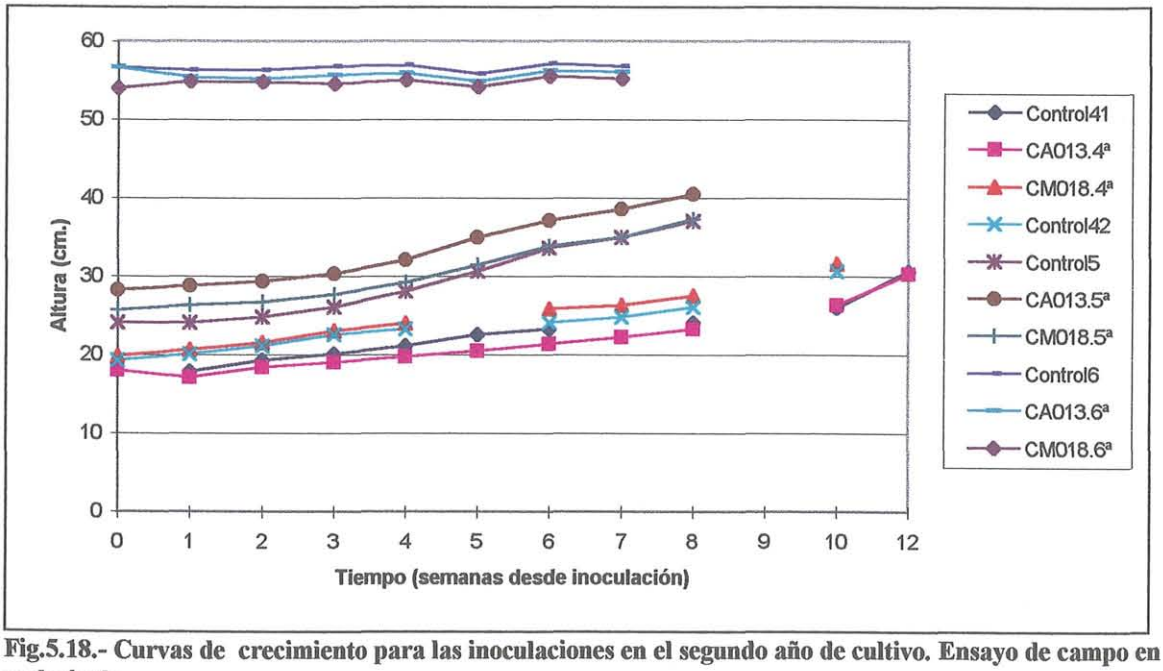


Fig.5.18.- Curvas de crecimiento para las inoculaciones en el segundo año de cultivo. Ensayo de campo en umbráculo.

Tabla 5.37.-Valores del intervalo de confianza para la comparación de la pendiente de las rectas de regresión del crecimiento en altura para las inoculaciones 1, 2 y 3 durante el período de primavera.

	Intervalos de confianza		
	Inoculación-1	Inoculación-2	Inoculación-3
CA013-CM018	-0,14460207	-0,261226307	0,273903435
	-0,39935793	-0,495353693	0,053696565
CA013-Control	0,024253283	0,005330293	0,307440968
	-0,267893283	-0,262910293	0,076459032
CM018-Control	0,273202105	0,37586171	0,166121842
	0,027117895	0,12313829	-0,109821842

5.3.2.4.2 Inoculaciones de segundo año

5.3.2.4.2.1 Curvas de crecimiento en altura.

Con los datos de altura de plantas tomados una vez por semana, durante un máximo de 12, se construye el gráfico de la Fig.5.18.

Evaluamos el ajuste de las curvas a la recta de regresión. En el Anejo 13.5 (Tablas de 13.5.22 a 13.5.31) se recogen las tablas con los parámetros de la regresión para cada curva. Todos los tratamientos de las inoculaciones 4 y 5 se ajustan bien al modelo lineal. La inoculación-6 se ajusta a rectas horizontales con pendiente nula (Tabla 5.38).

Tabla 5.38.-Resúmen de la estadística de las regresiones lineales para los datos de altura de plantas en las inoculaciones 4, 5 y 6 para el período de primavera. Valores de R^2 y R^2a en porcentaje.

Hongo	Inoculación	R^2	R^2a	MSE	F	p
CA013	4	88,84	88,39	343,48	198,99	0,0000
CM018	4	95,75	95,58	328,64	563,19	0,0000
Control1	4	90,95	90,57	322,41	241,15	0,0000
Control2	4	88,11	87,64	266,26	185,29	0,0000
CA013	5	90,83	90,46	484,59	247,65	0,0000
CM018	5	80,56	79,78	406,92	103,60	0,0000
Control	5	90,56	90,18	571,56	239,82	0,0000
CA013	6	0,00	---	0,0094	0,0001	0,9914
CM018	6	0,85	---	2,0052	0,1876	0,6692
Control	6	0,01	---	0,2100	0,0027	0,9586

La comparación entre tratamientos se realizó a partir del parámetro de pendiente para las inoculaciones 4 y 5, y de la ordenada en el origen para la inoculación-6, mediante el cálculo del intervalo de confianza explicado en el apartado 3.2.6.5.1. A partir de los valores expresados en la Tabla 5.39 comprobamos que no hay diferencias significativas, al nivel del 5%, entre los tratamientos en ningún caso.

Tabla 5.39.-Valores del intervalo de confianza para la comparación de la pendiente de las rectas de regresión del crecimiento en altura para las inoculaciones 4, 5 y 6. El asterisco recuerda que en el caso de la inoculación-6 el parámetro de comparación ha sido la ordenada en el origen.

	Intervalos de confianza		
	Inoculación-4	Inoculación-5	Inoculación-6*
CA013-CM018	0,120051773	0,500644876	8,526827782
	-0,226571773	-0,226204876	-5,654047782
CA013-Control	0,210957319	0,170949819	8,636880556
	-0,185977319	-0,453269819	-10,04632056
CM018-Control	0,261465582	0,097987053	4,862391758
	-0,150245582	-0,654747053	-9,144611758

5.4 RESÚMEN DE RESULTADOS

5.4.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

5.4.1.1 Primer ensayo

Se pone de manifiesto la influencia de la edad de la planta en la enfermedad producida por CA013 (es más agresivo en planta más joven). Este mismo efecto se produce con CL039 durante unas semanas intermedias aunque al final tiende a compensarse. Para *P.irregulare* parece que las primeras semanas desde la emergencia son más arriesgadas, pero incluso la inoculación en la 6ª semana alcanza el 50% de mortalidad a las 6 semanas de la inoculación. Es un porcentaje muy elevado por lo que sería recomendable proteger el cultivo. *P. paroecandrum* en las primeras tres semanas sigue un desarrollo de la enfermedad parecido a *P. irregulare* pero en ambas inoculaciones alcanza cerca del 80% de mortalidad a las 6 semanas de la inoculación, por lo que, incluso en caso de infecciones tardías y ante la imposibilidad de caracterizar la especie en campo con suficiente rapidez, el mantener el efecto residual del tratamiento durante el período de riesgo parece el proceder más sensato (además el efecto no siempre es el mismo).

La incidencia de la enfermedad en los primeros días desde la inoculación (7-14 según aislado) ha sido la misma para ambos momentos de inoculación. Parece ser que la planta de *Cupressus* en semillero en las condiciones del ensayo, presenta una menor sensibilidad al patógeno a partir de ese momento, es decir, cuando cuenta con 7 u 8 semanas de edad desde la emergencia. Esta tendencia se contradice con los resultados del segundo ensayo.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que, al cabo de 5-6 semanas desde la inoculación *P.paroecandrum* se comporta de forma distinta (posible efecto de la temperatura en las últimas semanas del ensayo).

Parece claro que existe un efecto de *Pythium* sobre el desarrollo de la raíz que consiste en la reducción del crecimiento en longitud de la raíz principal y que es dependiente del momento de inoculación; se produce más acusadamente en la inoculación sobre plantas más jóvenes (inoculación-1). La longitud de raíz siempre se encuentra más afectada que el tallo. La longitud del tallo no se ve afectada por el momento de la inoculación con ninguno de los dos aislados.

En ambas inoculaciones el patógeno ha penetrado en las raíces. La edad de la planta no parece influir en la capacidad del hongo para penetrar en las raíces. El hongo inoculado no ha influido en la recuperación, es decir, la capacidad de penetración en el huésped ha sido la misma. Plantas portadoras de inóculo pero sobrevivientes a la enfermedad y carentes de síntomas aparentes pueden ser comercializadas y utilizadas como sanas. La incidencia que este hecho y el de las modificaciones morfológicas en raíz vayan a tener en fases posteriores del cultivo no las conocemos. Requerirían de un estudio sistemático y complejo que habría de extenderse a varios años y que desbordaba nuestra capacidad.

En resumen, parece demostrada la existencia de una cierta relación entre la edad de la planta en el momento de sufrir el ataque del agente patógeno y la mortalidad o la expresión de síntomas.

5.4.1.2 Segundo ensayo

Una de las conclusiones más importantes es que el tipo de hongo inoculado (aislados de dos especies de *Pythium* distintas) no influye sobre ninguno de los parámetros utilizados por nosotros para evaluar los efectos de la enfermedad, pero que, por el contrario, el momento en que se realiza la inoculación (en relación a la edad de la planta-huésped) es el factor principal.

Otra conclusión importante del ensayo es que claramente la edad de la planta en el momento de entrar en contacto con el patógeno, es al menos uno de los factores decisivos en la expresión y en las consecuencias posteriores de la enfermedad. La inoculación realizada sobre plantas de solo dos semanas de edad desde la emergencia tiene efectos y consecuencias más graves que la inoculación sobre plantas tan solo cuatro semanas más desarrolladas. Del estudio de las curvas de progreso de enfermedad para ambos momentos de inoculación se deduce que las plantas más jóvenes han sufrido más gravemente los efectos de la enfermedad.

Sin embargo, la inoculación sobre las plantas de más edad consigue producir, al final del ensayo, una mortalidad acumulada muy próxima a la producida por la inoculación en planta más joven. La diferencia está en que el período de incubación para la primera es mayor (aproximadamente de cuatro semanas). Por ello, es conveniente proteger el semillero durante todo su desarrollo, ya que los daños pueden ser muy cuantiosos incluso con infecciones tardías. Pero en este punto hay que tener en cuenta que, probablemente, el hecho de la escasez de huésped susceptible de ser colonizado, a medida que el propio patógeno iba destruyendo las plántulas, ha favorecido que la mortalidad acumulada al final del ensayo para ambos momentos de inoculación lleguen a prácticamente igualarse.

Ligado con esto se encuentran los efectos del patógeno sobre el crecimiento de las plantas supervivientes y de apariencia normal. El crecimiento del tallo sufrió una reducción comparado con las plantas sanas, en ambas inoculaciones, aunque el efecto es más acusado en la inoculación sobre plantas más jóvenes. La reducción en longitud de la raíz principal es aún más evidente para la inoculación sobre planta más joven, mientras que los resultados no son claros para la inoculación sobre planta de mayor edad. Los pesos frescos y secos dan resultados erráticos, posiblemente por su elevada variabilidad.

En resumen, el sistema radicular sufre alteraciones por la presencia del patógeno (al igual que en el primer ensayo). En este caso, incluso la parte aérea se ha visto reducida (por contra a lo que ocurría en el primer ensayo) lo que solo nos permite afirmar que la relación entre el patógeno y los efectos sobre este parámetro responden a una situación más compleja que no hemos sido capaces de determinar.

5.4.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO

5.4.2.1 Inoculaciones en primer año de cultivo

5.4.2.1.1 Incidencia de la enfermedad: mortalidad y expresión de síntomas

Parece existir un marcado efecto del momento de inoculación diferenciándose entre la inoculación-1, la inoculación-2 (realizadas ambas en la fase de semillero) y la inoculación-3 (en el momento del transplante). El efecto del patógeno disminuye marcadamente en función de la edad del cultivo. Parece que el efecto es el mismo sin distinción del aislado utilizado en la inoculación, aunque la virulencia es algo superior con CM018 (aislado de *Pythium intermedium*) incluso aunque fue aplicado con una concentración de esporas inferior.

Lo mismo ocurre con la expresión de los síntomas, aunque dada la elevada variabilidad de los datos no podemos afirmarlo con rotundidad.

Parece aconsejable entonces proteger la siembra, emergencia y primeras 2-3 semanas de cultivo desde la emergencia.

5.4.2.1.2 Recuperación de patógeno

La recuperación del patógeno de las raíces de las plantas asintomáticas al final del ensayo (después de un año de cultivo) está claramente influida por el momento en que se realiza la inoculación (antes o después del transplante). El tipo de hongo no ha tenido ningún efecto, ambos parecen comportarse de la misma forma respecto a este parámetro. Puede ser que a medida que la planta va siendo mayor el hongo es incapaz de penetrar en las raíces y afectarlo (a pesar de que ambos inóculos se obtuvieron de raíces enfermas de plantas de 1-2 años de edad) o que, si bien el hongo fue capaz de penetrar en ciertas raíces más débiles, la planta de más edad fue capaz de producir nuevas raíces sanas y liberarse de las partes dañadas.

Es evidente que el hongo, una vez ha penetrado en el huésped, se conserva en el sistema radicular de las plantas al menos durante 16 meses, aún sin provocar enfermedad.

El transplante no ha supuesto una etapa de mayor sensibilidad de la planta frente a la enfermedad, al contrario de lo que cabría esperar, por lo que no es una fase que deba ser especialmente protegida. Se confirma que el momento más delicado se corresponde con la etapa de semillero (primavera-verano) antes del transplante, cuando la planta cuenta con pocas semanas de vida desde la emergencia.

5.4.2.1.3 Efectos sobre el crecimiento

Las inoculaciones en primavera han provocado una evidente reducción en el crecimiento tanto de la raíz principal como del tallo. A medida que la planta se desarrolla el

efecto sobre el crecimiento no es tan claro, los resultados han variado según el hongo inoculado.

Por el contrario, después de un año de cultivo, aún cuando las plantas siguen conservando el inóculo en elevada proporción en su sistema radicular, las alteraciones en el crecimiento han desaparecido. La inoculación en el momento del transplante, lejos de haber provocado una disminución en el crecimiento, parece haber supuesto un estímulo en el crecimiento del tallo en longitud.

Los efectos del patógeno parecen disminuir en relación estrecha con el momento de la inoculación (o sea, con la edad de la planta) para todos los parámetros estudiados: mortalidad, crecimiento y recuperación del patógeno de las raíces del huésped.

5.4.2.2 Inoculaciones en segundo año de cultivo

Las inoculaciones en el segundo año de cultivo no han tenido ningún efecto sobre los parámetros medidos: ni sobre la mortalidad, ni sobre el crecimiento en longitud, ni en la aparición de síntomas de enfermedad. Puede afirmarse que, en las condiciones del ensayo, la convivencia en un mismo medio físico del patógeno y de la planta huésped no supone un daño para la planta.

De los datos de recuperación de patógeno de las raíces de las plantas inoculadas parece deducirse que a medida que la planta envejece se hace menos sensible a la acción del hongo, quien muy posiblemente no es capaz de penetrar en las raíces con la misma facilidad con que lo puede hacer en planta joven, de semillero. Por tanto, la protección en la fase de semillero es la más importante a la hora de controlar la enfermedad durante todo el cultivo.

Sin embargo, ambos aislados se obtuvieron de raíces de plantas enfermas en fase de cultivo posterior al transplante. La conclusión lógica sería que la penetración del patógeno se produjo en la fase de semillero y las condiciones ambientales, que no hemos podido reproducir en campo, pudieron haber determinado la expresión de la enfermedad en fases posteriores.

Por otro lado parece también claro que, por regla general, no hay diferencias entre los resultados obtenidos con ambos inóculos. El hecho de que las inoculaciones se hayan realizado con suspensiones de distintas estructuras fúngicas (oosporas, oogonios, hinchamientos hifales o "hyphal swellings", además de restos de micelio y algunos esporangios) no ha supuesto ninguna diferencia en el comportamiento ni en los efectos de ambas especies. Dicho de otro modo, ninguna de dichas estructuras parece reportar una ventaja en su comportamiento como patógeno. Incluso las diferencias en la concentración de esporas de los inóculos no han producido diferencias. Dado que en las dos especies estudiadas el comportamiento frente a la producción de enfermedad ha sido semejante, podría pensarse que su reacción ante los métodos de control debe de ser también similar.

5.5 DISCUSIÓN

5.5.1 ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Aún cuando la diferencia en la mortalidad producida en las semanas intermedias del ensayo es muy acusada en favor de la inoculación-1, tales diferencias se amortiguan en las semanas finales de los ensayos (quinta y sexta desde la inoculación). En el primer ensayo podría tener cierta influencia el que las temperaturas fueron algo superiores en la segunda parte del mismo, por lo que el inóculo de *P. paroecandrum* se pudo haber visto beneficiado por este hecho, ya que, según VAN DER PLAATS-NITERINK (1981), su temperatura óptima de patogenicidad ronda los 28ºC. Por otro lado, el hecho de que la concentración final de esporas en el inóculo para la inoculación-2 fuera bastante inferior a la de la inoculación-1 no parece haber influido negativamente sobre la agresividad del patógeno al final del primer ensayo. En el segundo ensayo, con igualdad de concentración de inóculo, el resultado ha sido similar en este punto, aunque no tan acusado. De acuerdo con dicha tendencia, es recomendable **mantener el efecto residual del tratamiento** desde las primeras semanas, en vista de la posibilidad de infecciones tardías.

En cuanto al efecto del patógeno sobre el crecimiento del huésped, nuestros resultados confirman los de LARKIN Y COL. (1995) sobre los efectos de *P. irregulare* sobre raíz en alfalfa. Dichos autores afirman que la infección de plantas de alfalfa en semillero con *P.irregulare* da como resultado la reducción del crecimiento del sistema radicular y cambios en la estructura de la raíz, induce una menor longitud total del sistema radicular y menor complejidad en su estructura. Las raíces de las plantas inoculadas presentan menos niveles de ramificación radicular (números de orden menores) y de tipo monopódico. LARKIN Y COL. sostienen que el patógeno mantiene el sistema radicular en estado juvenil o inmaduro. Los cambios en la estructura de la raíz pueden ser efecto directo de la infección por el patógeno o el resultado de una adaptación de la planta a la alteración en la capacidad de absorber agua y nutrientes que sufre por efecto de la infección soportada en la raíz. Dichos cambios morfológicos, junto con otros factores de estrés ambiental pueden contribuir a la enfermedad, e incluso la muerte, de las plantas en etapas posteriores. También SOUTHERN Y COL. (1976) aluden a la reducción observada en la altura de plantas y en peso seco de raíz de soja al inocular con *P. irregulare* en pre y post-emergencia. Nosotros hemos observado que, aunque aparentemente sanas, las plantas en contacto con el patógeno encuentran reducido su sistema radicular fundamentalmente en la inoculación en planta más joven para los dos patógenos estudiados.

5.5.2 ENSAYOS DE CAMPO EN UMBRÁCULO

Con nuestros ensayos de campo queríamos determinar el momento más probable y más peligroso para la infección, con objeto de recomendar la especial vigilancia de ese momento. Además, dado que nuestros aislados habían sido obtenidos a partir de plantas afectadas que mostraban los síntomas después del transplante, queríamos comprobar si con facilidad el hongo era capaz de colonizar las raíces del huésped y producir síntomas de enfermedad (reducción en crecimiento, muerte, necrosis, podredumbre de raíces, etc.) en el momento del transplante y compararlo con inoculaciones anteriores y posteriores, o si por el contrario la penetración del patógeno en el huésped se producía con mayor probabilidad en la fase de semillero.

Sabíamos que la colonización por parte del patógeno de las células de la raíz se limita a aquellas células en las que no se ha producido el engrosamiento secundario de las paredes celulares, es decir, que la lignificación de las paredes de las células limita el avance de *Pythium* (HENDRIX Y CAMPBELL,1973).

Nosotros esperábamos que la inoculación de los patógenos en el momento del transplante, cuando las débiles y frágiles raicillas de las plántulas sufren cuantiosos daños y quedan expuestas numerosas heridas que pueden facilitar la entrada de los hongos, produjera enfermedad en importancia notable, en consonancia con lo que sucede en hortícolas, donde la colonización de las raíces se produce en el momento del transplante (STANGHELLINI Y KRONLAND,1986). HANSEN Y COL. (1979) registraron muerte de árboles forestales después del transplante en el terreno definitivo, pero eran plantas que provenían de viveros infectados con especies de *Pythium* y *Phytophthora*. Además, observaron mayor incidencia de podredumbre de raíz en las plantas que habían sufrido recortes en el sistema radicular en el momento del transplante. Por el contrario, BHATTI Y KRAFT (1992) afirman que no detectaron mayor incidencia de enfermedad en plantas de garbanzo inoculadas con *P.ultimum* y otros patógenos de suelo cuando recortaban las raíces antes de la inoculación.

Pero los ensayos de campo corroboran la idea de que *Pythium* afecta fundamentalmente a las plantas en las primeras semanas de vida y que, aunque en fases posteriores el hongo es capaz de penetrar en cierta cantidad en las raíces del huésped, su capacidad de producir enfermedad disminuye drásticamente con el tiempo. El transplante no ha favorecido a la enfermedad, contrariamente a nuestras hipótesis previas.

Los resultados de las inoculaciones en planta de 2 años en nuestros ensayos de campo tampoco han podido reproducir la enfermedad, de forma similar a lo que les sucedió a MOULIN Y COL (1996) con plantas de tomate en cultivo hidropónico inoculadas con *P.irregulare* y *P.intermedium*. Según HENDRIX Y CAMPBELL (1973), la patogenicidad de *Pythium* en plantas adultas es difícil de demostrar. De la misma forma que ocurre con otros patógenos, *Pythium* spp. no es patógeno en todas las condiciones ambientales, principalmente en cuanto a temperatura y humedad se refiere. Estos hongos son más dependientes de esas condiciones ambientales que otros. Muy posiblemente sea esta la causa por la que no hemos conseguido reproducir la virulencia de la enfermedad en los ensayos de campo, mientras que todos los aislados se han mostrado muy virulentos en los ensayos en condiciones controladas.

En este sentido, es importante tener en cuenta que las plantas supervivientes y asintomáticas conservan el hongo en su sistema radicular, es decir, son **portadoras**. Pueden servir de reserva de inóculo y propagarlo a otros medios donde contagiar a otras plantas susceptibles o, pueden también exteriorizar la enfermedad posteriormente, durante su cultivo en el emplazamiento definitivo, ya sea jardín, masa boscosa o parque, público o privado.

Nuestros resultados también confirman los de RONCADORI Y MCCARTER (1971) cuando afirman que la severidad de la enfermedad producida por *P.irregulare* sobre plantas de algodón normalmente decrece cuando la edad de la planta aumenta. Estos autores admiten que *Pythium* spp. puede causar podredumbres de raíz en plantas adultas, pero que en condiciones de campo su capacidad de reducir el crecimiento se limita probablemente a las primeras fases del cultivo, ya que la temperatura del suelo aumenta durante el verano y se vuelve desfavorable para el patógeno, y además la resistencia del huésped aumenta con la edad.

La edad de la planta condiciona la expresión de la enfermedad (PERRIN Y SAMPANGI,1986). Las siembras tempranas, cuando las temperaturas son aún bajas en nuestras condiciones, favorecen la enfermedad. Las plántulas de coníferas en vivero están expuestas al "damping-off" por un período de tiempo de 2 a 3 semanas, durante el que son muy vulnerables. Las condiciones climáticas reinantes durante ese período podrán determinar tanto la gravedad del ataque como los patógenos que van a producir la enfermedad (PERRIN Y SAMPANGI,1986). Cuanto más largo es el período de germinación y el establecimiento de las plántulas en semillero, más riesgo existe de que un patógeno de suelo actúe y produzca enfermedad (HARTZ,1994).

Con plantas de *Antirrhinum majus* MELLANO Y COL. (1970) observaron que las plantitas inoculadas a los 15 días, o antes, desde la siembra, morían en 6 días, mientras que las inoculadas a los 20, 25 y 30 días sobrevivieron. Formularon otra hipótesis para explicar la distinta sensibilidad entre las plantas de distinta edad. La diferencia entre plantas sensibles y tolerantes estriba en que, en ambos casos, el patógeno penetra en las raíces y las invade pero la colonización de los tejidos es diferente. Por tanto, la tolerancia de las raíces de las plantas de mayor edad a las infecciones de *Pythium* se debe a una interacción huésped-parásito que se desarrolla después de la penetración y no a la pura lignificación de los tejidos cuando maduran. Parece que el hongo pierde su capacidad para colonizar las partes viejas de las raíces primarias y secundarias, cesa en su crecimiento y forma estructuras reproductoras (oosporas).

Cuanto más temprana es la infección por parte del patógeno, más graves serán los daños producidos por la enfermedad (HENDY Y ROBERTS,1974). Incluso se llega a afirmar que las plántulas a veces se infectan cuando emergen del suelo, pero después ya no son susceptibles al "damping-off" (LUMSDEN Y COL.,1976) y que la susceptibilidad del huésped en el momento de la infección es el factor más importante, y la combinación más peligrosa es la de una infección en plántula de semillero de un huésped sensible (HENDY Y ROBERTS,1974).

Asimismo hay discrepancias de criterio. PERRIN Y SAMPAGNI (1986) estudiando la enfermedad "damping-off" en viveros forestales en Francia, afirmaron que no existía correlación entre la virulencia de la enfermedad y factores tales como especie huésped o edad de la plántula; la incidencia de la enfermedad estaba más influida por las condiciones meteorológicas locales acontecidas durante la emergencia de las plántulas.

De forma similar a lo que ocurre con los ensayos en condiciones controladas con los aislados CA013 y CL039, el comportamiento de los aislados CA013 y CM018, de dos especies de *Pythium* distintas, tuvieron un comportamiento, en general, similar. Se deduce, por tanto, que, a efectos prácticos, a la hora de diagnosticar el agente causal de una enfermedad producida por *Pythium* no es necesario precisar la especie.

En resumen, queda demostrado que la edad de la planta en el momento en que entra en contacto con el patógeno es un factor principal que afecta a la incidencia de la enfermedad producida por *Pythium* sobre plantas de *C.arizonica* en semillero y primer año de cultivo, y conlleva también ciertas irregularidades en el desarrollo posterior de las plantas supervivientes y sin síntomas aparentes de enfermedad. La más evidente de ellas es la limitación en el crecimiento de la raíz, que podría justificarse por la capacidad que tiene la planta de crecer con un sistema radicular escaso durante un cierto tiempo cuya duración ignoramos. Evidentemente llega un momento en que el límite de resistencia de la planta ante esta adversidad se rebasa y la planta comienza a presentar daños en parte aérea. Además, en ciertos casos se produce un estímulo en el crecimiento del tallo, fenómeno que ha sido detectado con algunos otros hongos patógenos como sistema de asegurar la extensión de la enfermedad.

El interés de estudiar la relación entre la virulencia del patógeno (o la gravedad de la enfermedad) con el estado de desarrollo de la planta (edad) y los efectos que puede producir en planta adulta fue analizado por HENDY Y ROBERTS (1995) quienes lo consideraron importante a la hora de poder predecir la gravedad de la podredumbre de raíz en fases posteriores del cultivo.

6. ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED: EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS

6.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

De las observaciones y visitas que realizamos a las instalaciones y zonas destinadas a la producción de plantas ornamentales en viveros de la Comunidad de Madrid, en el transcurso de las cuales tomamos muestras de las plantas con síntomas de enfermedad y de cuyo estudio obtuvimos los resultados expuestos en el apartado 4, pudimos apreciar que , en uno de ellos (uno de los más afectados por diversas especies de *Pythium*) se daba el siguiente fenómeno: plantas de diversas especies, principalmente arbustos, compartían el mismo túnel de plástico en las primeras semanas de la primavera durante su proceso de germinación o estaquillado. Los síntomas de enfermedad (que más tarde comprobamos eran producidos por *Pythium*) afectaban por igual a la mayoría de las plantas así cultivadas pertenecientes a géneros tan diversos como *Hedera*, *Thymus*, *Rosmarinus*, *Lavandula*, *Crataegus*, *Deutzia*, *Ligustrum* o *Pyracantha*. Junto a ellas, sin separación, se cultivaban petunias y pensamientos, pero, por el contrario, en éstas últimas no se apreciaban síntomas aparentes de enfermedad.

A la vista de este hecho cabían dos posibilidades: que las petunias y pensamientos no fueran plantas huéspedes de las especies de *Pythium* aisladas de ese mismo vivero, y que, por otra parte son muy polífagas (VAN DER PLAATS-NITERINK, 1981); o bien que nuestros aislados fueran capaces de colonizar las plantas de petunias y pensamientos (anteriormente habíamos aislado *Pythium* y *Thielaviopsis* de plantas de pensamiento enfermas) pero no produjeran efectos visibles a corto plazo. De confirmarse la segunda posibilidad el peligro estaría en la difusión de la enfermedad a través de las plantas portadoras asintomáticas.

Por este motivo decidimos acometer unos trabajos destinados a aclararnos este punto. Realizamos tres ensayos consecutivos.

6.1.1 PRIMER ENSAYO

Con este ensayo intentamos una primera aproximación al estudio de los síntomas de la enfermedad producida por los aislados de *Pythium irregulare* (CA013), *P. intermedium* (CM018) y *P. paroecandrum* (CL039) sobre plantas de *Petunia* en semillero. En concreto, se evalúa el efecto de las inoculaciones artificiales con los aislados mencionados sobre la mortalidad y el crecimiento de plantas de semillero de *Petunia hybrida*, medido este último como la longitud del tallo y la longitud de la raíz principal (o raíz más desarrollada) y se comprueba la posibilidad de recuperar al patógeno inoculado a partir de las raíces de las plantas.

6.1.2 SEGUNDO ENSAYO

A la vista de los resultados del primer ensayo planteamos el segundo y tercer ensayos con objeto de confirmar las tendencias que habíamos observado. Tanto en el segundo ensayo como en el tercero solo evaluamos el efecto de dos aislados, el CA013 de *Pythium irregulare* y el CL039 de *P. paroecandrum*. Se descartó el aislado CM018 de *P.intermedium* porque en

el primer ensayo parecía comportarse de forma similar a los otros y había sido aislado por nosotros con una frecuencia menor que los otros dos. Esta vez se trabajó con concentraciones iguales de inóculo para ambos aislados y se sometió a todas las plantas a las mismas condiciones ambientales controladas.

Recogimos datos de mortalidad y síntomas externos de enfermedad cada 5 días y longitudes de tallo y raíz más desarrollada, pesos frescos y secos de parte aérea y sistema radicular y datos de porcentaje de recuperación de patógeno al final del ensayo.

6.1.3 TERCER ENSAYO

El tercer ensayo es una repetición del segundo con condiciones similares tanto de inóculo como de incubación. Se registraron los valores de las mismas variables que en el ensayo anterior.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 PRIMER ENSAYO

La siembra se realizó siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.4.1 con la salvedad de que utilizamos semilla comercial de *Petunia hybrida* (ver 3.1.2 MATERIAL VEGETAL) aplicando de 15 a 20 semillas por alvéolo.

Las semillas se sembraron el 11 de mayo de 1994 y la emergencia tuvo lugar a los 12 días de la siembra. Para la germinación los alvéolos se dispusieron en una cámara de cultivo en el laboratorio con 16 h/luz y 8 h/oscuridad y una temperatura de 20-25 ºC. El número de plantas nacidas por alvéolo fue de 15. Se consideraron 3 grupos de 15 plantas por cada tratamiento. La inoculación se llevó a cabo en la segunda semana desde la emergencia, es decir, con plantitas de 4 semanas de edad desde la siembra.

Se inocularon las plantas con tres especies de hongos patógenos, un aislado de cada una de las tres especies siguientes: el aislado CA013 de *P.irregulare*, CM018 de *P.intermedium* y CL039 de *P.paroecandrum.* El origen de los aislados y el modo de preparar los inóculos se detallaron en los epígrafes 3.1.4 y 3.2.4.2 respectivamente.

Las concentraciones de las suspensiones de esporas que se obtuvieron fueron las siguientes:

Para CA013: $6{,}25.10^4$ esporas/ml
Para CL039: $3{,}3.10^4$ esporas/ml
Para CM018: $3{,}13.10^4$ esporas/ml

Se aplicó una dosis de inóculo de 5 ml. de suspensión por alvéolo, con lo que las dosis finales de inóculo quedan de la siguiente manera: 725 cfu/g.ss para CA013, 383 cfu/g.ss para CL039 y 363 cfu/g.ss para CM018.

Las plantas inoculadas con CL039 y uno de los controles sin inóculo se mantuvieron en la cámara de cultivo del laboratorio sometidas a un fotoperíodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad y a unas temperaturas mínima/máxima de 22/28ºC (Tabla 6.1). Se procuró mantener al hongo alrededor de su temperatura óptima de patogénesis que está establecido en la literatura en 28ºC (VAN DER PLAATS-NITERINK, 1981). El resto de los tratamientos y el segundo control se cultivaron en cámara de cultivo mantenida con el mismo fotoperíodo y un termoperíodo de 16 a 24ºC (Tabla 6.1), ya que 21ºC es el óptimo citado para *P.irregulare* por VAN DER PLAATS-NITERINK (1981).

Tabla 6.1.-Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin) registradas en la cámara de cultivo en los ensayos realizados con los aislados patógenos de *P.irregulare, P.intermedium* y *P.paroecandrum* inoculados sobre plantas de *Petunia hybrida* en semillero. Primer ensayo.

	P.irregulare (CA013), *P.intermedium* (CM018)		*P.paroecandrum* (CL039)	
ddi	Tmin.	Tmax.	Tmin.	Tmax.
0	15	21	18	24
5	17	21	21	24
10	15	21	20	25
15	15	20	22	28
20	17	25	22	29
25	18	30	22	30
30	15	32	25	32
35	15	25	25	32

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo (Temperaturas en °Celsius)

	CA013/CM018	CL039
Temperatura media de las maximas:	24,4 ± 4,5	28,0 ± 3,3
Temperatura media de las minimas:	15,9 ± 1,3	21,9 ± 2,4

Se registraron cada 5 días los datos de mortalidad (en porcentaje acumulado) y síntomas en parte aérea, y al final del ensayo los de crecimiento (longitud de raíz más desarrollada y longitud de tallo) y síntomas en parte aérea y raíz. Sin embargo, solo se analizaron estadísticamente los datos de longitud de tallo y longitud de raíz más larga, ya que ninguna planta murió por efecto del inóculo. El procedimiento de toma de datos queda detallado en el epígrafe 3.2.4.5.

6.2.2 SEGUNDO ENSAYO

Tomando como referencia las conclusiones extraídas del primer ensayo repetimos la experiencia con las plantas de *Petunia* dos veces más, pero solo con los inóculos de *P.irregulare* (CA013) y *P.paroecandrum* (CL039). Además de las longitudes de raíz y tallo, también se recogieron los datos de pesos frescos y secos tanto de parte aérea como de sistema radicular y se cuantificó la recuperación de patógeno al finalizar la experiencia.

Todas las operaciones (siembra, preparación de inóculo, inoculación, etc.) se realizan de la misma forma que en el primer ensayo. Se disponen seis repeticiones por tratamiento con un máximo de 8 plantas por repetición, y un total aproximado de entre 15 y 20 plantas por tratamiento.

La siembra se realizó el 24 de octubre de 1995 y la emergencia se produjo en la semana del 7-8 de noviembre, a los 15 días de la siembra. La germinación tuvo lugar en la

cámara de cultivo en el laboratorio con el mismo fotoperíodo (16 h/luz y 8 h/oscuridad) y unas temperaturas mínima/máxima de 17/24,5ºC (Tabla 6.2).

Tabla 6.2.-Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), humedad relativa (HR) del aire y temperatura del sustrato (Tsust) en relación a la temperatura del aire (Taire) registradas en la cámara de cultivo a las 9:00 horas en los ensayos realizados con los dos aislados patógenos *P.irregulare* y *P.paroecandrum* inoculados sobre plantas de *Petunia hybrida*. Segundo ensayo.

ddi	Tmin (°C)	Tmax (°C).	HR (%).	Taire (9h)	Tsust.(9h)
-20 s	18	24	82	23	22
-15	17	23	85	20	19
-10	17	28	80	20	--
-5	17	23	85	22	20,5
0 i	17	26	81	24	23
5	17,5	28,5	83	21	19,5
10	23,5	28	91	22,5	19,5
15	16,5	28	92	18,5	16,5
20	16,5	24,5	80	21	19
25	16	24	94	20	17,5
30	16	24,5	83	21	18,5
35	18	23	95	21	19

ddi= días desde inoculación; s= siembra; i= inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas: 25,4±2,2
Temperatura media de las minimas: 17,5±2,0
Humedad Relativa del aire (%): 85,9±5,6

La inoculación se llevó a cabo el día 16 de noviembre de 1995, en la segunda semana desde la emergencia, es decir, con plantitas de 3-4 semanas de edad desde la siembra.

Las concentraciones finales de las suspensiones de los inóculos fueron:

Para CA013: $6{,}9.10^4$ esporas/ml
Para CL039: $7{,}0.10^4$ esporas/ml

Se aplicó una dosis de inóculo de 5 ml. de suspensión por alvéolo. A los controles se les aplicó una suspensión de medio V-8 en agua en las mismas proporciones. Las dosis finales de inóculo fueron de 801 cfu/g.ss para CA013 y 812 cfu/g.ss para CL039.

Las plantas se mantuvieron en la cámara de cultivo sometidas a un fotoperíodo de 16 horas/luz y 8 horas/oscuridad y a un termoperíodo de 17,5 a 25,4 ºC. La humedad relativa osciló alrededor del 86% (Tabla 6.2).

El ensayo se dio por finalizado el 22 de diciembre de 1995, a las 5 semanas desde la inoculación (35 días). Durante el ensayo se evaluaron los síntomas externos y la mortalidad (en porcentaje acumulado de plantas muertas sobre el total de plantas) cada 5 días y se midieron las longitudes de raíz más desarrollada y tallo y pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea al final del ensayo, así como el porcentaje de recuperación del patógeno inoculado de la forma indicada en el epígrafe 3.2.4.5.

6.2.3 TERCER ENSAYO

El tercer ensayo con *Petunia hybrida* se repitió entre marzo y abril de 1996. Las semillas se sembraron el 5 de marzo de 1996, la emergencia tuvo lugar en la semana del 18 de marzo (a los 15 días de la siembra) y la inoculación se produjo el día 27 de marzo de 1996, en la primera semana desde la emergencia. El ensayo finalizó el 25 de abril, aproximadamente a las 5 semanas desde la inoculación (38 días).

El procedimiento fue en todo el mismo que para el segundo ensayo. Se dispusieron 6 repeticiones por tratamiento con 6 plantas cada una, en total un máximo de 36 plantas por tratamiento. Los controles se componen de 4 repeticiones de 7 plantas como máximo.

Se inoculó con los aislados CA013 y CL039 a una concentración de $7{,}3.10^4$ esporas/ml y con 5 ml por alvéolo, lo que produjo una dosis final de inóculo de 847 cfu/g.ss. Las plantas se cultivaron en una cámara controlada a 18/23,5 °C de temperaturas medias de mínimas y máximas, 16 h/luz y 8 h/oscuridad, y 77% de humedad relativa (Tabla 6.3).

Tabla 6.3.-Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), humedad relativa (HR) del aire y temperatura del sustrato (Tsust) en relación a la temperatura del aire (Taire) registradas a las 9:00 horas en la cámara de cultivo en los ensayos realizados con los dos aislados patógenos *P.irregulare* y *P.paroecandrum* inoculados sobre plantas de *Petunia hybrida.* Tercer ensayo.

Ddi	Tmin.(°C)	Tmax (°C).	HR (%).	Taire(9h)	Tsust.(9h)
-13 s	18	24	86	23	22
-10	18	23	81	23	22
-7	18	23,5	65	22	20
-4	18	22	70	22	21
0 i	18	23	85	21,5	20
5	17,5	23,5	71	22	20,5
10	17	24	81	24	23
20	17	23	88	22	19
25	20	26	86	22,5	20
30	17	23	65	21	19
35	17,5	24	65	23	22
38	17	22,5	84	21	19,5

ddi= días desde inoculación; s= siembra; i= inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas: 23,5±1,0
Temperatura media de las minimas: 17,8±0,8
Humedad Relativa (%): 77,3±9,3

A los 38 días de la inoculación se extraen las plantas de sus contenedores y se recogen los datos de longitudes de raíz más desarrollada y tallo y de pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea, se observan los síntomas en raíces y parte aérea (señales de necrosis, estrangulamientos, clorosis, etc.) y las raíces se procesan para el cálculo del porcentaje de recuperación del patógeno inoculado de la forma indicada para el ensayo anterior.

6.2.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

En todos los ensayos se ha utilizado un diseño estadístico de bloques al azar. En la mayoría de los casos los datos cumplieron las hipótesis previas exigidas por el análisis de varianza F de Snedecor, por lo que no se empleó ninguna transformación. Solo en el caso de la variable "longitud de tallo" para el primer ensayo hubo que recurrir a la estadística no paramétrica (ver epígrafe 3.2.6).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 PRIMER ENSAYO

6.3.1.1 Incidencia de la enfermedad

Aún cuando en un principio pretendíamos evaluar también la mortalidad producida por los inóculos, a lo largo del ensayo no murió ninguna planta por efecto del inóculo, presentando únicamente indicios de amarillez o clorosis en parte aérea, principalmente en las inoculadas con el aislado de *P.irregulare*. Las raíces de las plantas fueron observadas al final del ensayo, resultando que no presentaban síntomas aparentes de enfermedad (no presentaban necrosis de tejidos ni estrangulamientos) a diferencia de lo que ocurría en otras inoculaciones de estos mismos hongos sobre plantas de *Cupressus arizonica*, en donde encontrábamos elevados porcentajes de mortalidad y síntomas evidentes de daños en raíz en las plantas supervivientes a los tratamientos.

6.3.1.2 Longitud de tallo

Los resultados del análisis de los datos se resumen en la Tabla 6.4 y la Figura 6.1. Los datos no se ajustan a una distribución normal y por tanto se evalúan mediante el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis, resultando que no se detectan diferencias significativas, aunque a un nivel de significación muy próximo al 5% (H(4, N=15)=9,3666; p=0,0526) (Tabla 6.5).

No obstante, la comparación de medias mediante el test U de Mann-Whitney (Tablas 6.4 y 13.8.1) señala ligeras diferencias (valores de "p" muy próximos a 0,05) entre el control y los tratamientos mantenidos en la misma cámara de cultivo y entre ambos inóculos entre sí (Tabla 13.8.1). Por otro lado, no hay diferencias significativas entre el tratamiento con el inóculo CL039 de *P. paroecandrum* y su control correspondiente (Tabla 13.8.1). También se aprecian ligeras diferencias entre ambos controles (Tabla 13.8.1). parece que las plantas testigo crecidas a temperaturas más suaves han tenido un desarrollo superior (Fig.6.1) y, posiblemente, este hecho haya favorecido la expresión de los efectos de los inóculos sobre el crecimiento de las plantas.

6.3.1.3 Longitud de raíz

Esta variable sí cumple con las hipótesis previas, incluso sin necesidad de transformación. El estudio mediante ANOVA F resulta en que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Tabla 6.5). La comparación de medias mediante los tests LSD, Duncan y Scheffé establece diferencias significativas entre CA013, CM018 y su control aunque no hay diferencias entre ambos hongos (Tablas 6.4 y 13.8.3 y Fig.6.1). No existen diferencias significativas entre CL039 y su control (Tabla 13.8.3 y Fig.6.1). Al igual que ocurre con la longitud de tallo, el crecimiento de la raíz más desarrollada del control sometido

a temperaturas más suaves es significativamente superior al control sometido a temperaturas más elevadas (Fig.6.1).

Tabla 6.4.-Efecto del hongo inoculado sobre las longitudes de raíz más desarrollada y tallo de las plantas de *Petunia hybrida* al final del primer ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests paramétricos LSD, Duncan y Scheffé de comparación de medias para la variable "longitud de raíz" y el test no paramétrico U de Mann-Whitney para la variable "longitud de tallo".

Inóculo	Longitud de raíz (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
P.irregulare	7,11± 0,48 b	2,07± 0,03 c
P.intermedium	7,16± 0,91 b	3,49± 0,36 b
Control 1	10,47± 0,54 a	7,10± 0,35 a

Inóculo	Longitud de raíz (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
P.paroecandrum	5,56± 0,12 a	3,22± 1,34 a
Control 2	6,10± 0,45 a	3,54± 0,25 a

6.3.1.4 Recuperación de patógeno

Aunque en este primer ensayo no se cuantificó, sí que podemos afirmar que los hongos inoculados se recuperaron a partir de los sistemas radiculares de la mayoría de las plantas de *Petunia*.

Tabla 6.5.-Efecto del hongo inoculado sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) para los ensayos primero, segundo y tercero con *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor Hongo	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Primer ensayo	11,45459	0,00094*	9,36667	0,05260
Segundo ensayo	4,54887	0,03936*	0,22875	0,79957
Tercer ensayo	7,04813	0.00845*	2,78297	0,09862

+ Valor del estadístico H(4,15) del ANOVA de Kruskal-Wallis.

6.3.2 SEGUNDO ENSAYO

6.3.2.1 Incidencia de la enfermedad

Registramos mortalidad, medida como porcentaje acumulado de plantas muertas en función del tiempo y síntomas de enfermedad cada 5 días.

En este ensayo tampoco se produce muerte alguna en las plantas de *Petunia* inoculadas artificialmente con los hongos patógenos durante todo el ensayo. Se confirma, por tanto, el resultado obtenido en el primer ensayo.

Simultáneamente observamos los síntomas aparentes de enfermedad cada 5 días. Al quinto día desde la inoculación no se observaron síntomas de enfermedad; en los tres tratamientos (los dos aislados y el control) las plantas parecen desarrollarse con normalidad. En algunos bloques el crecimiento en tamaño de las plantas ha sido notable. Al décimo día desde la inoculación, en algunos bloques inoculados con CL039 se observó un cierto amarilleamiento de algunas hojas, aunque no se podía considerar como una clorosis definida. Cinco días después, no se apreciaron cambios con respecto a la observación anterior. Se apreció un crecimiento en talla similar en todos los tratamientos. Al vigésimo día aparecieron síntomas evidentes de clorosis en algunas plantas inoculadas con CA013, aunque también los presentaban algunas plantas del control sano. El crecimiento del resto era normal. Los cuellos de las plantas no presentaban alteraciones. En el vigésimo quinto día, aunque uno de los bloques del control mostraba una ligera clorosis, en general el crecimiento había sido notable y las plantas crecían vigorosas. En el tratamiento con el aislado CA013 se apreciaban claros indicios de clorosis en todos los bloques, que comenzaba generalmente por la parte baja del vegetal y se extendía progresivamente hacia las partes superiores; incluso aparecieron algunas pequeñas necrosis en hojas. Los cuellos no aparecían necrosados ni oscurecidos, pero si se mostraban algo debilitados. Las plantas inoculadas con el aislado CL039 no presentaban síntomas tan claros, aunque detectamos algunas zonas de necrosis foliar y manchas cloróticas. Por último, a los treinta días de la inoculación los controles presentaban un buen desarrollo, con solo un ligero amarilleamiento en las partes bajas de las plantas de uno de los bloques. En el tratamiento con CA013 persistieron la clorosis en todos los bloques y la necrosis en hojas en algunos bloques. De forma similar, en las plantas inoculadas con CL039 la clorosis se hace muy patente en los cuellos y va ascendiendo hacia las hojas superiores.

6.3.2.2 Longitudes de tallo y raíz

El test ANOVA F no detecta diferencias significativas en el crecimiento en longitud del tallo para ninguno de los tratamientos (Tablas 6.5 y 6.6 y Fig.6.2). Por tanto, parece que ninguno de los inóculos ha tenido efecto alguno sobre las plantas.

Para la variable "longitud de raíz", según el ANOVA F, se acepta la existencia de diferencias significativas para un nivel de confianza del 95% (Tabla 6.5). Para los tests múltiples de comparación de medias LSD y Scheffé ($p<0,05$) las medias del control y del tratamiento con CA013 pertenecen a poblaciones distintas, mientras que no hay diferencias

entre CL039 y su control ni entre ambos hongos (Tablas 6.6 y 13.8.5). Sin embargo, el test de Duncan no aprecia diferencias significativas entre ningún tratamiento (Tablas 6.6 y 13.8.5).

En este caso, parece que el crecimiento de la raíz más desarrollada se ha podido ver algo limitado por efecto del inóculo de *P.irregulare*, aunque la reducción no sea muy evidente (Fig.6.2).

Tabla 6.6.-Efecto del hongo inoculado sobre las longitudes de raíz más desarrollada y tallo de las plantas de *Petunia hybrida* al final del segundo ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD y Scheffé de comparación de medias para la variable "longitud de raíz" y los tests LSD, Scheffé y Duncan para la variable "longitud de tallo".

Inóculo	Longitud de raíz (cm.)*	Longitud de tallo (cm.)
P.irregulare	11,07±1,57 b	9,98±0,97 a
P.paroecandrum	12,49±1,65 ab	10,79±1,15 a
Control	16,98±0,80 a	10,69±0,61 a

*Según Duncan no hay diferencias significativas en ningún caso para la longitud de raíz.

6.3.2.3 Pesos frescos de parte aérea y sistema radicular

Los datos de peso fresco de parte aérea confirman el resultado obtenido con las longitudes del tallo, no hay diferencias significativas en ningún caso (Tablas 6.7 y 6.8 y Fig. 6.3).

Parece que la ligera diferencia registrada en las longitudes de raíz más desarrollada no se detecta en los pesos frescos del sistema radicular. No hay diferencias significativas entre los tratamientos (Tablas 6.7 y 6.8 y Fig. 6.3)

Tabla 6.7.-Efecto del hongo inoculado sobre los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea de las plantas de *Petunia hybrida* al final del segundo ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según el análisis de varianza F de Snedecor.

	Pesos frescos (g)		Pesos secos (g)	
Inóculo	Raíz	Parte aérea	Raíz	Parte aérea
P.irregulare	0,2291± 0,0877 a	2,5127±0,7227 a	0,0638± 0.0157 a	0,3421± 0,0752 a
P.paroecandrum	0,5302± 0,1589 a	2,3275± 0,3445 a	0,0860± 0.0389 a	0,3022± 0,0434 a
Control	0,3865± 0,1011 a	3,3938± 0,5526 a	0,1144± 0.0168 a	0,5417± 0,0940 a

Tabla 6.8.-Efecto del hongo inoculado sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) para el segundo y el tercer ensayos con *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor Hongo	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Segundo ensayo	1,75126	0,22281	0,85192	0,45536
Tercer ensayo	0,01551	0,98463	0,63931	0,54347

Factor Hongo	Variable dependiente			
	Peso seco raíz		Peso seco parte aérea	
	F	p	F	p
Segundo ensayo	1,07576	0,37744	2,77929	0,10969
Tercer ensayo	3,01835	0,08381	0,69689	0,51581

6.3.2.4 Pesos secos de parte aérea y sistema radicular

No se detectan diferencias significativas en el ANOVA F para ninguna de las variables (Tablas 6.7 y 6.8 y Fig.6.3). Se confirman los resultados obtenidos con los pesos frescos.

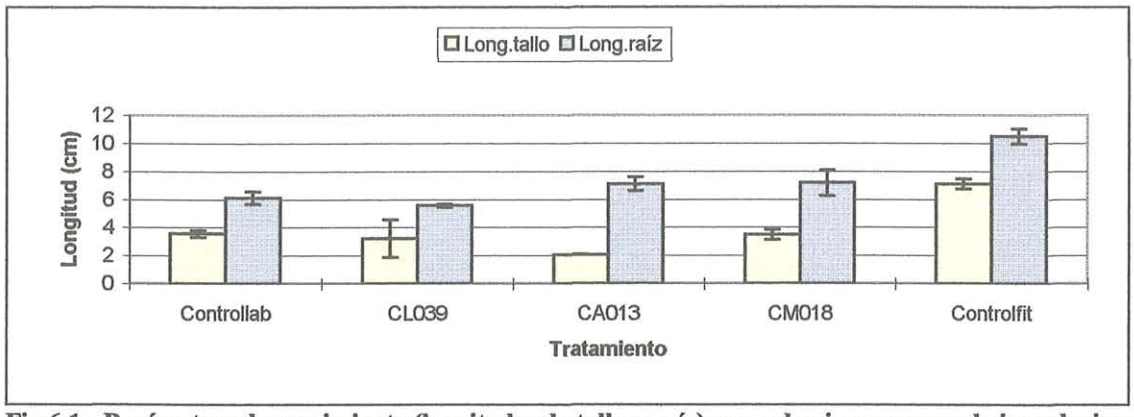


Fig.6.1.- Parámetros de crecimiento (longitudes de tallo y raíz) para el primer ensayo de inoculaciones en semillero de *Petunia hybrida*.

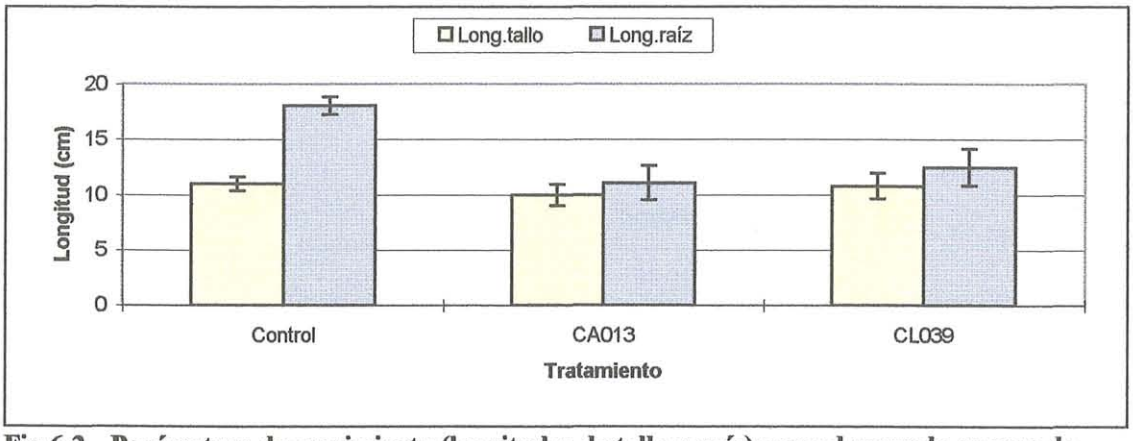


Fig.6.2.- Parámetros de crecimiento (longitudes de tallo y raíz) para el segundo ensayo de inoculaciones en semillero de *Petunia hybrida*.

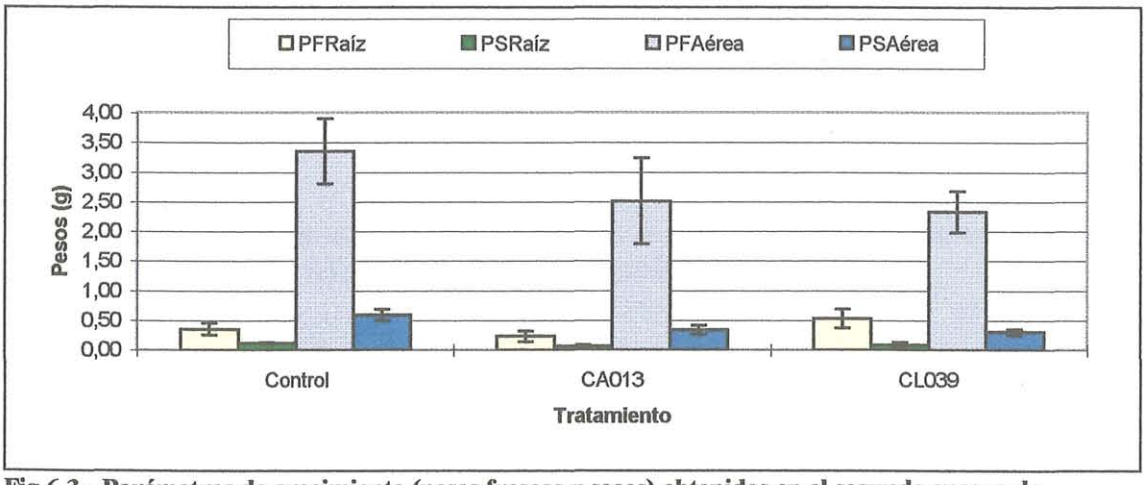


Fig.6.3.- Parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) obtenidos en el segundo ensayo de inoculaciones en semillero de *Petunia hybrida*.

6.3.2.5 Recuperación de patógeno

Los porcentajes de recuperación del patógeno obtenidos a partir de las raíces de las plantas inoculadas son muy elevados (Fig.6.4), con valores muy próximos al 100% para ambos hongos (Tabla 6.9).

Los datos de porcentaje se transformaron según lo indicado en el epígrafe 3.2.6.2 para este tipo de datos. El resultado del análisis de varianza F (F=1,36026; p=0,2817) confirma la no existencia de diferencias significativas entre ambos hongos al nivel de confianza del 95% (Tabla 6.9).

Tabla 6.9.-Efecto del hongo inoculado sobre la recuperación de patógeno. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p>0,05) según ANOVA F de Snedecor.

	Recuperación de patógeno (%)
Inóculo	Segundo ensayo
P.irregulare	97,20±2,80 a
P.paroecandrum	87,50±7,21 a
Control	0,00±0,00 b

6.3.3 TERCER ENSAYO

6.3.3.1 Incidencia de la enfermedad

Se confirma, en todo, lo ocurrido en los dos ensayos precedentes, tanto en cuanto a mortalidad como en lo referente a síntomas detectados.

6.3.3.2 Longitudes de tallo y raíz

Al aplicar el análisis de varianza F de Snedecor a los datos de la variable "longitud de raíz" se detectan diferencias significativas al nivel del 5% (Tablas 6.5 y 6.10 y Fig.6.5). De la comparación de medias se deduce que ambos hongos se comportan de la misma forma respecto al control, esto es, se diferencian significativamente de él (p<0,05) y no se diferencian entre sí. El mismo resultado se obtiene con los tres tests considerados (Tabla

13.8.9). Hay que tener en cuenta que, al contrario de lo ocurrido en los anteriores, en este ensayo el control presenta un valor medio para estas variables inferior al de las plantas inoculadas.

Tabla 6.10.-Efecto del hongo inoculado sobre las longitudes de raíz más desarrollada y tallo de las plantas de *Petunia hybrida* al final del tercer ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD, Duncan y Scheffé de comparación de medias para cada variable.

Inóculo	Longitud de raíz (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
P.irregulare	7,19±0,99 a	8,63±0.36 a
P.paroecandrum	9,19±0,59 a	9,08±0.47 a
Control	5,20±0,56 b	8,18±0.76 a

6.3.3.3 Pesos frescos de parte aérea y sistema radicular

Se confirman los resultados obtenidos en el segundo ensayo: no se detectan diferencias significativas en ningún caso para ninguna de las variables (Tablas 6.8 y 6.11 y Fig.6.6 y 6.7).

Tabla 6.11.-Efecto del hongo inoculado sobre los pesos frescos y secos de raíz y parte aérea de las plantas de *Petunia hybrida* al final del tercer ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según el análisis de varianza F de Snedecor.

	Pesos frescos (g)		Pesos secos (g)	
Inóculo	**Raíz**	Parte aérea	**Raíz**	Parte aérea
P.irregulare	0.0610± 0,0211 a	0,8811± 0,1036 a	0,0720± 0,0111 a	0.0120± 0,0035 a
P.paroecandrum	0.0648± 0,0096 a	0,9479± 0,0852 a	0,0862± 0,0096 a	0,0156± 0,0026 a
Control	0.0586± 0,0141 a	1,4119± 0,2353 a	0,0883± 0,0206 a	0,0063± 0,0016 a

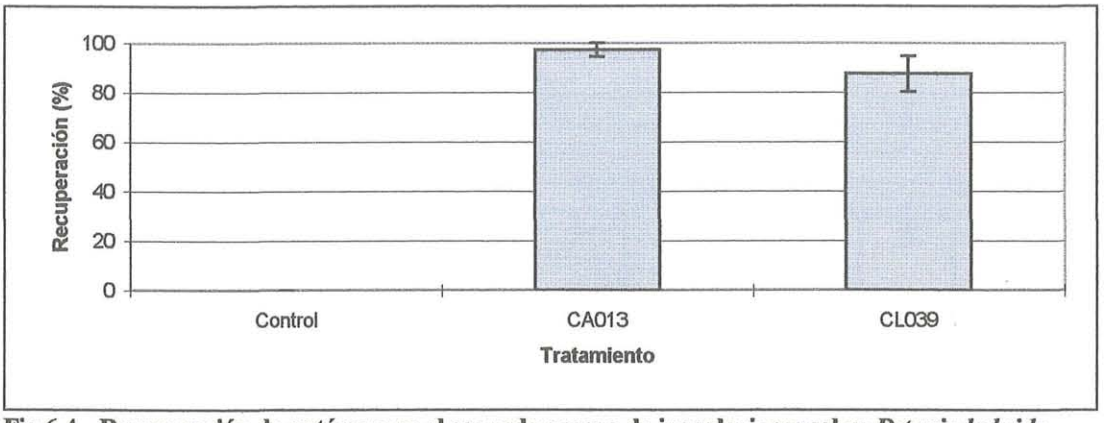


Fig.6.4.- Recuperación de patógeno en el segundo ensayo de inoculaciones sobre *Petunia hybrida*.

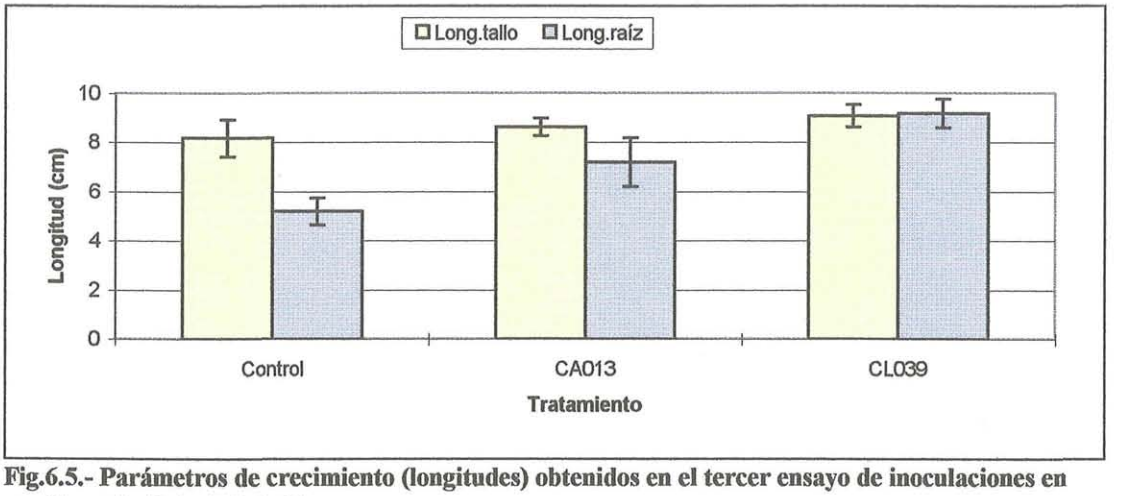


Fig.6.5.- Parámetros de crecimiento (longitudes) obtenidos en el tercer ensayo de inoculaciones en semillero de *Petunia hybrida*.

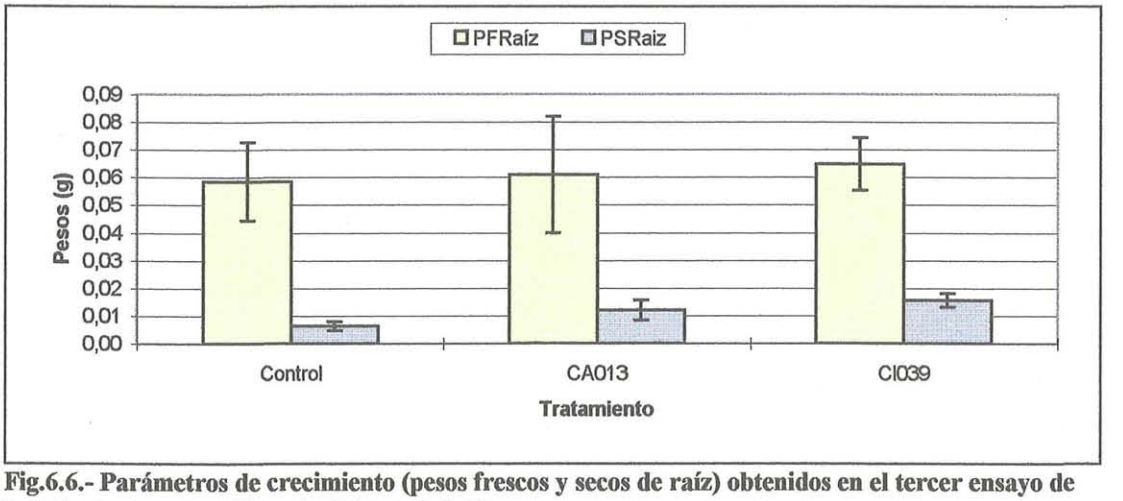


Fig.6.6.- Parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos de raíz) obtenidos en el tercer ensayo de inoculaciones en semillero de *Petunia hybrida*.

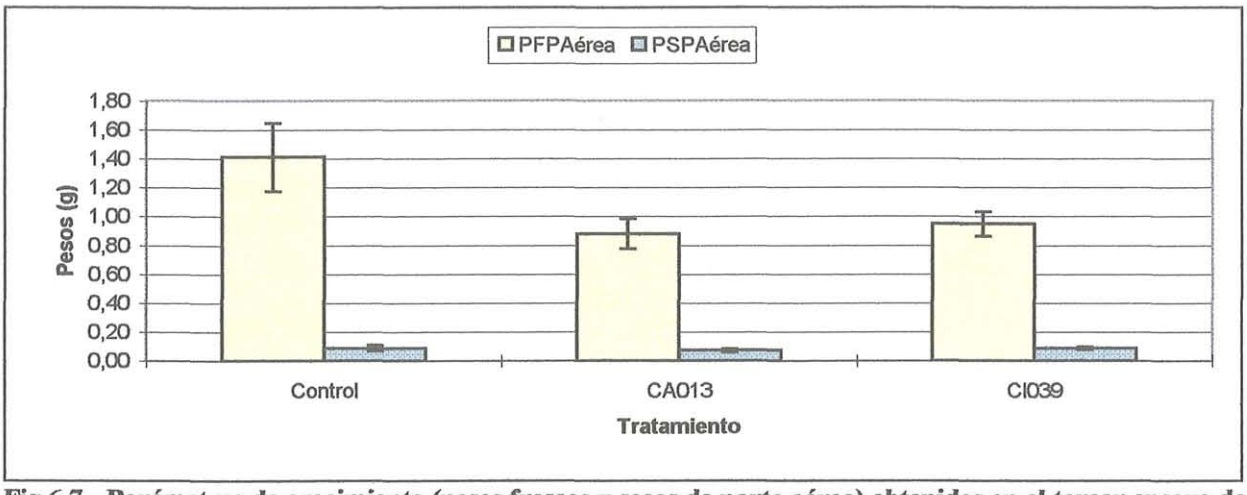


Fig.6.7.- Parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos de parte aérea) obtenidos en el tercer ensayo de inoculaciones en semillero de *Petunia hybrida*.

6.3.3.4 Pesos secos de parte aérea y sistema radicular

También para estas variables se confirman los resultados obtenidos en el ensayo anterior: no se detectan diferencias significativas en ningún caso para ninguna de las variables (Tablas 6.8 y 6.11 y Fig.6.6 y 6.7).

6.3.3.5 Recuperación de patógeno

En el tercer ensayo tampoco se cuantificó el porcentaje de recuperación del patógeno inoculado, aunque sí se comprobó que el hongo se recuperaba de las plantas inoculadas y no de las plantas testigo sin inocular.

6.4 DISCUSIÓN

En esta parte del trabajo queríamos comprobar si nuestros aislados de *Pythium*, procedentes de coníferas, eran capaces de producir enfermedad en *Petunia* y, en caso afirmativo, saber por qué no se habían visto afectadas las plantas en las condiciones normales de cultivo en el vivero que nos servía de referencia. Partíamos del hecho de que las tres especies de *Pythium* eran polífagas y de estudios precedentes de especificidad de huésped. Por ejemplo, en *Pythium sylvaticum* (o *Pythium debaryanum*) se había encontrado falta de especialización de huésped (un aislado obtenido de zanahoria era también patógeno sobre pino) (VAARTAJA,1975).

Pero, ninguno de los aislados produjo la muerte de las plántulas de *Petunia hybrida*, al contrario de lo que hemos visto en capítulos anteriores que ocurrió en el caso de plántulas de *Cupressus arizonica* inoculadas con los mismos aislados. En la obra de DAUGHTREY Y COL. (1995), *Petunia hybrida* no está expresamente citada como huésped de especies de *Pythium*. Solo se cita la enfermedad producida por *Pythium irregulare* y otras especies del mismo género sobre *Primula* spp. Sí está descrita la enfermedad "podredumbre de raíz" producida por *Pythium* sobre *Petunia* (ENGELHARD, 1992).

Encontramos algunas referencias en que apoyar nuestros resultados. Por un lado, REY Y COL (1996) afirman que la susceptibilidad de cada especie vegetal frente al ataque de *Pythium* spp. es distinta. Además, MOULIN Y COL. (1994) encontraron que en cultivos sin suelo de pepino los síntomas producidos por *Pythium* spp. no son siempre evidentes. A veces aparecen lesiones localizadas en las raíces. que pueden extenderse y provocar la muerte de la raíz; pero, en otros casos, la parte aérea de las plantas pueden marchitarse durante los días calurosos del verano incluso sin que haya síntomas evidentes de necrosis en las raíces (MOULIN Y COL.,1994).

DAUGHTREY Y COL. (1995) describen los síntomas de la enfermedad producida por *Pythium* en plantas de flor en maceta como amarilleamientos o clorosis de parte aérea y pequeñas lesiones y necrosis de los ápices de raíz y raíces laterales. Nosotros no hemos detectado tales alteraciones en los sistemas radiculares, pero es posible que los ápices necrosados y las débiles raicillas laterales se hayan degradado en el sustrato y no hayamos sido capaces de recuperarlas ni observarlas. Según los síntomas observados por nosotros durante los ensayos, parece que el patógeno tiene un cierto efecto sobre las jóvenes plantas de *Petunia*, fundamentalmente produciendo amarilleamientos en el follaje. Posiblemente la ausencia de tales síntomas en el vivero se deba a la acción de las aportaciones fertilizantes o a las condiciones ambientales.

El crecimiento de las plantas de *Petunia* inoculadas no se ha visto afectado en términos generales, sobre todo al considerar el desarrollo, en su conjunto, de la parte aérea y del sistema radicular (pesos frescos y secos). La longitud del tallo parece verse algo reducida por el efecto del inóculo en el caso de las especies *P. irregulare* y *P. intermedium* en el primer ensayo. Sin embargo, en los otros dos ensayos no se apreció tal diferencia. El inóculo de *P. paroecandrum* no tuvo ningún efecto en ninguno de los ensayos.

Sobre la longitud de la raíz más desarrollada el efecto no es claro. Posiblemente el inóculo de *P.irregulare* (CA013) tiende a reducir el crecimiento de la raíz principal significativamente respecto al crecimiento normal, aunque hay que tener en cuenta que en el tercer ensayo el efecto fue el contrario. ya que las plantas del testigo sano mostraron una longitud de raíz menor que las plantas inoculadas. Una posible explicación sería el modelo de crecimiento de las raíces de *Petunia*, más fasciculado que pivotante, que hace de este parámetro un carácter de discutible utilidad, hecho que nos impulsó a trabajar complementariamente con los pesos frescos y secos del sistema radicular en su totalidad.

Las raíces asintomáticas obtenidas de plantas cultivadas comercialmente sin suelo pueden estar colonizadas consistentemente por *Pythium* spp (REY Y COL.,1996). Precisamente este hecho llevó a SALT (1979) a englobar algunas especies de este género dentro de los "patógenos menores" ("minor pathogens"). Es decir, que algunas especies del género *Pythium* pueden establecer una doble relación con la planta-huésped. Por un lado, pueden provocar los síntomas característicos de la enfermedad que describimos en el apartado 1.INTRODUCCIÓN GENERAL de esta Memoria (podredumbres y necrosis en los tejidos de la raíz y del cuello, marras en nascencia, depresión, marchitez, clorosis, etc.), actuando como patógenos altamente virulentos; pero además, sometidos a ciertas condiciones (ambiente y/o características del huésped) pueden comportarse como parásitos menores, en el sentido de provocar enfermedad de consecuencias no tan fácilmente reconocibles (STANGHELLINI Y KRONLAND,1986). En nuestro caso, parece claro que *Petunia* es un huésped que acoge a las especies estudiadas de *Pythium*, actuando en este último sentido.

En un estudio epidemiológico realizado en Francia se demostró que plantas de tomate, procedentes de un cultivo sin suelo, cuyas raíces se hallaban generosamente colonizadas por *Pythium* spp. no mostraban síntomas aparentes de enfermedad en dichas raíces (REY Y COL.,1996). Estos autores aislaron una mayoría (75%) de cepas de *Pythium* grupo F, y demostraron su patogenicidad sobre plantas de tomate, aunque generalmente se les achaca una producción de síntomas sensiblemente menor que la de otras especies de *Pythium*, como *P.ultimum* o *P.aphanidermatum*. Esta experiencia coincide con lo obtenido por nosotros considerando huéspedes tan diferentes como *Cupressus* y *Petunia*. De hecho, otros autores también aislaron hongos del género *Pythium* de raíces asintomáticas de *Agrotis palustris* (HODGES Y COLEMAN,1985) y de lechuga (STANGHELLINI Y KRONLAND,1986).

Las raíces de *Agrostis* infectadas no evidenciaban lesiones o podredumbres en raíz aunque los autores observaron la presencia de *P.arrhenomanes* y *P.aristosporum* en los pelos absorbentes, los ápices de crecimiento de las raíces secundarias y en los tejidos cortical y vascular de las mismas. Al igual que nos ocurre a nosotros con las plantas de *Petunia*, HODGES Y COLEMAN (1985) encontraron que *Pythium* afecta al crecimiento de las plantas de *Agrostis palustris*, pero ni las mata ni produce síntomas en su sistema radicular. Los autores sugieren una interferencia en la absorción del agua y la translocación de los nutrientes que produce daños evidentes en las plantas cuando la temperatura ambiente es elevada, pero que permite la coexistencia de patógeno y huésped en condiciones ambientales favorables a la planta. Otra posibilidad sería la producción de toxinas o de reguladores del crecimiento por parte del hongo que inhibirían el crecimiento de la planta.

También en el estudio de STANGHELLINI Y KRONLAND (1986) con lechuga, los autores detectan una amplia colonización de las raicillas absorbentes por parte de varias especies de

Pythium, entre ellas *P.dissotocum* y *P.irregulare,* con la particularidad de la ausencia de síntomas de enfermedad tanto en raíz como en parte aérea, pero con notables reducciones en las producciones (desde un 12 hasta alrededor de un 50% según temperatura).

Asimismo, hay citada una importante reducción en el crecimiento de plantas de geranio en invernadero provocada por *P.ultimum* (CHAGNON Y BELANGER,1991). En el mismo trabajo se advierte de la importancia económica de este tipo de daños que no mata la planta pero que permite que la enfermedad continúe sin ser detectada hasta que el daño ya esta hecho.

El hecho de que hayamos sido capaces de reaislar el patógeno previamente inoculado de las raíces de las plantas de *Petunia* de semillero en porcentajes elevados confirma la idea de que estos hongos son capaces de penetrar en los tejidos de la planta cuando entran en contacto con ella, al menos en las primeras etapas del cultivo de *Petunia* y, además, existe la posibilidad de que las plantas así cultivadas actúen como portadoras del inóculo del patógeno, extendiendo la enfermedad.

7. CONTROL: MOMENTO DE APLICACIÓN DEL FUNGICIDA

7.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Una vez puesta de manifiesto la elevada virulencia de los aislados de las tres especies de *Pythium* evaluadas por nosotros en este trabajo, y basándonos en el hecho de que la mayoría de los viveristas de planta ornamental de la Comunidad de Madrid utilizaban de forma sistemática el fungicida comercial Aliette® para el control de las enfermedades producidas por los pitiáceos, decidimos estudiar con más detalle el efecto del momento de aplicación de dicho fungicida sobre el control de la enfermedad producida por dos de nuestros aislados en plántulas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene.

Concretamente, se trataba de comprobar la influencia que tiene el tratamiento con el fungicida comercial Aliette® sobre el progreso de la enfermedad producida a causa de la inoculación artificial de los aislados CA013 de *Pythium irregulare* y CL039 de *Pythium paroecandrum* sobre las plántulas de *Cupressus arizonica* en semillero, en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo, para distintos momentos de aplicación del fungicida en relación al momento de inoculación, edad de la planta, especie inoculada y concentración del inóculo.

Realizamos cuatro ensayos; en los cuatro se utilizó el aislado CA013 y en tres se inoculó con CL039. En el primero de los ensayos se evaluó el efecto de dos concentraciones de inóculo con el aislado CA013.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales empleados en estos ensayos se corresponden en todo con lo detallado en el epígrafe 3.2.4. ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS. En todos los casos la inoculación se realizó en la segunda semana desde la emergencia de las semillas.

El fungicida empleado en estos ensayos fue el producto comercial Aliette® (Rhône-Poulenc) cuya materia activa es el fosetil-aluminio (tris etilfosfonato de aluminio) al 80%. Se trata de una formulación en polvo mojable que se preparó en una concentración de 1,5 gr/l y con la que se regó el sustrato a razón de 2 l/m^2 de semillero.

Según la información recogida en el "*Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*" (DE LIÑAN, 1996), Aliette® es un fungicida sistémico con capacidad de traslocación ascendente y descendente y está recomendado para el control preventivo y curativo de oomicosis. Especialmente citado para su empleo en viveros de cupresáceas, tanto en aplicación al suelo o a la parte aérea mediante el agua de riego e intensamente utilizado, con carácter preventivo y curativo, por los productores de planta ornamental de la Comunidad de Madrid.

7.2.1 DISEÑO ESTADÍSTICO

El estudio realizado se compone de cuatro ensayos llevados a cabo con el aislado CA013 (ensayos 1, 2, 3 y 4) y tres con el aislado CL039 (ensayos 2, 3 y 4).

Se trata de ensayos factoriales completamente aleatorizados con dos factores: hongo inoculado y momento de aplicación del fungicida, excepto en el primer ensayo, donde los factores estudiados fueron concentración del inóculo y momento de aplicación del fungicida.

Por lo general, se disponen cuatro controles y doce tratamientos, que son los siguientes:

Cuatro controles:

T-T: plantas sin inóculo y sin aplicación de fungicida.
T-A: plantas sin inóculo pero tratadas con el fungicida al mismo tiempo que las del tratamiento A(-1).
CA013: plantas inoculadas con el aislado CA013 en el tiempo 0 y sin tratamiento fungicida.
CL039: plantas inoculadas con el aislado CL039 en el tiempo 0 y sin tratamiento fungicida.

Seis tratamientos para cada inóculo (en total doce):

A(-1): plantas inoculadas en tiempo 0 pero tratadas con el fungicida una semana antes de la inoculación.
A(0): inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida en el mismo momento de la inoculación.
A(1): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida una semana después de la inoculación.
A(2): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida dos semanas después de la inoculación.
A(3): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida tres semanas después de la inoculación.
A(4): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida cuatro semanas después de la inoculación.

Los tratamientos correspondientes a cada inóculo se representaran como A(i)-j, siendo "i" el momento de aplicación del fungicida (en semanas desde la inoculación) y tomando "j" el valor "13" para las inoculadas con CA013 y "39" para las inoculadas con CL039.

Por su parte, en el primer ensayo los tratamientos son los siguientes:

Cuatro controles:

T-T: plantas sin inóculo y sin aplicación de fungicida
T-A: plantas sin inóculo pero tratadas con el fungicida al mismo tiempo que las del tratamiento A(-1).

CA013 (3): plantas inoculadas con el aislado CA013 en el tiempo 0, con una concentración de inóculo de $3{,}5.10^4$ esporas/ml, y sin tratamiento fungicida.
CA013 (6): plantas inoculadas con el aislado CA013 en el tiempo 0, con una concentración de inóculo de $6{,}3.10^4$ esporas/ml y sin tratamiento fungicida.

Seis tratamientos para cada concentración de inóculo (en total doce):

A(-1): plantas inoculadas en tiempo 0 pero tratadas con el fungicida una semana antes de la inoculación.
A(0): inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida en el momento de la inoculación.
A(1): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida una semana después de la inoculación.
A(2): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida dos semanas después de la inoculación.
A(3): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida tres semanas después de la inoculación.
A(4): plantas inoculadas en tiempo 0 y tratadas con fungicida cuatro semanas después de la inoculación.

Los tratamientos correspondientes a cada concentración de inóculo se representaran como A(i)-j, siendo "i" el momento de aplicación del fungicida (en semanas desde la inoculación) y tomando "j" el valor "3" para la concentración de inóculo menor y "6" para la mayor.

En todos los casos, la toma de los datos de mortalidad se realizó con periodicidad semanal. Los datos de los parámetros de crecimiento y de recuperación del patógeno inoculado se tomaron al final de cada ensayo, sobre las plantas supervivientes a la enfermedad. Ocasionalmente también se comprobó la recuperación del patógeno de una selección de las plantas muertas cada semana.

Los análisis estadísticos se realizaron siguiendo en todo las directrices expuestas en el epígrafe 3.2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

7.2.2 PRIMER ENSAYO

El hongo inoculado fue el aislado CA013 de *P. irregulare*, en suspensión de esporas y micelio en dos concentraciones: $3{,}5.10^4$ y $6{,}3.10^4$ esporas/ml. Se aplicaron 5 ml de dichas suspensiones por alvéolo, con lo que las dosis finales de inóculo quedaron como 406 y 730 cfu/g.ss, respectivamente.

Se consideran 6 repeticiones del control T-T y 2 repeticiones del resto de los tratamientos, con un número medio de plantas por repetición de 50.

La inoculación se realiza en la segunda semana desde la emergencia. El ensayo se da por terminado a los 42 días desde la inoculación (a las seis semanas de la inoculación).

Durante el ensayo las plantas se dispusieron en la cámara de cultivo descrita en el apartado 3.2.4.4, con las particularidades de termoperíodo y humedad relativa que se recogen en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1.-Primer ensayo. Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), en grados Celsius, registradas en la cámara de cultivo en el ensayo realizado con el aislado patógeno CA013 de *P.irregulare*, para dos concentraciones de inóculo y seis momentos de aplicación del fungicida Aliette ®.

	P.irregulare (CA013)	
ddi	Tmin.	Tmax.
0	18	23
7	18	23
14	18	24
21	18,5	22
28	17	23
35	17,5	22
42	18	23

ddi= días desde inoculación.

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas:22,9±0,7
Temperatura media de las minimas: 17,9±0,5
Humedad Relativa (%): 85,0±6,5

7.2.3 SEGUNDO ENSAYO

En el segundo ensayo se trabajó con los dos aislados patógenos CA013 y CL039, aplicados en una concentración de inóculo que se ajustó a $6{,}4.10^4$ esporas/ml para CA013 y $7{,}5.10^4$ esporas/ml para CL039. Al aplicar una dosis de 5 ml de suspensión por alvéolo se obtuvieron unas concentraciones de inóculo de 700 y 900 cfu/g.ss respectivamente.

Se dispusieron tres repeticiones de cada tratamiento y de los controles, con un número medio por repetición de 35 plantas. La duración total del ensayo fue de 9 semanas desde el momento de la inoculación. La inoculación también se realiza en la segunda semana desde la emergencia.

Los datos que se recogieron desde el momento de la inoculación fueron mortalidad (semanalmente) y longitudes de raíz principal y tallo (al final del ensayo y medidas sobre las plantas supervivientes). Aunque no se recogieron datos de recuperación del patógeno inoculado para su análisis estadístico, siempre se comprobó que la recuperación se situaba en el 100% de las plantas muertas y alrededor del 80% de las plantas supervivientes. Los controles sanos (T-T y T-A) sufrieron una elevada mortalidad en las semanas finales del ensayo; sin embargo, se comprobó la ausencia del patógeno en dichas plantas.

Los dos inóculos se someten a unas condiciones ambientales ligeramente diferentes, en lo que se refiere a termoperíodo, procurando unas temperaturas ligeramente superiores al inóculo CL039 con objeto de favorecer su patogenicidad (Tabla 7.2). Para cada una de dichas condiciones se dispusieron sendos controles T-T y T-A.

Tabla 7.2.-Segundo ensayo. Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), en grados Celsius, registradas en las cámaras de cultivo en el ensayo realizado con los aislados patógenos CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum*, para seis momentos de aplicación del fungicida Aliette ®.

	P.irregulare (CA013)	
ddi	Tmin.	Tmax.
0	15	21
7	16	22
14	15	22
21	---	---
28	15	22
35	15	26
42	20	23
49	20	23

ddi= días desde inoculación.

Fluctuación durante todo el ensayo
(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas:
22,7±1,6
Temperatura media de las minimas:
16,6±2,4
Humedad Relativa (%): 85,0±6,4

	P.paroecandrum (CL039)	
ddi	Tmin.	Tmax.
0	16	21
7	16	20
14	17	22
21	17	24
28	18	24
35	20	23
42	21	24
49	21	25

ddi= días desde inoculación.

Fluctuación durante todo el ensayo
(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas:
22,9±1,7
Temperatura media de las minimas:
18,3±2,1
Humedad Relativa (%): 87,5±7,8

7.2.4 TERCER ENSAYO

En el tercer ensayo tratamos de comprobar las tendencias apuntadas en los dos ensayos anteriores. Inoculamos las plantas nuevamente con los dos aislados patógenos CA013 y CL039. Se aplicaron en una concentración de inóculo de $6{,}9.10^4$ esporas/ml para CA013 y $7{,}0.10^4$ esporas/ml para CL039, que resulta en unas concentraciones finales de 800 y 810 cfu/g.ss respectivamente.

Se dispusieron tres repeticiones de cada tratamiento y de los controles, con un número medio por repetición de 33 plantas. La duración total del ensayo fue de 5 semanas desde el momento de la inoculación. La inoculación se realiza en la segunda semana desde la emergencia.

Se tomaron semanalmente datos de mortalidad y, al final del ensayo, longitudes de raíz principal y tallo y pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes.

Las condiciones ambientales durante el ensayo se encuentran recogidas en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3.-Tercer ensayo. Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), humedad relativa del aire (HR) y temperatura del sustrato (Tsust) en relación a la temperatura del aire (Taire), registradas a las 10:00 horas en la cámara de cultivo en los ensayos realizados con los aislados patógenos CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum*, inoculados sobre plantas de *Cupressus arizonica*.

	P.irregulare (CA013)				
ddi	Tmin.(°C)	Tmax (°C).	HR (%).	Taire(10h)	Tsust.(10h)
-7	17	28	81	21	19,5
0	15,5	22	73	20	20,5
7	14	21	95	14	12,5
14	14	22,5	80	19,5	15
21	14	20	83	16,5	14,5
28	14	21,5	94	16	15
35	14,5	21,5	92	17,5	17

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas: 22,4±2,6
Temperatura media de las minimas: 14,7±1,2
Humedad Relativa (%): 85,4±8,3

	P.paroecandrum (CL039)				
ddi	Tmin.(°C)	Tmax (°C).	HR (%).	Taire(10h)	Tsust.(10h)
-7	17	18	81	21	19,5
0	17,5	26	73	23,5	23
7	16	28	95	22,5	16
14	16,5	24,5	80	21	19
21	16	24,5	83	21	18,5
28	15	23	94	18	17
35	18	24	92	21	19,5

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas: 24,0±3,1
Temperatura media de las minimas: 16,6±1,0
Humedad Relativa (%): 85,4±8,3

7.2.5 CUARTO ENSAYO

En el cuarto y último ensayo repetimos las inoculaciones con los dos aislados patógenos CA013 y CL039. Se aplicaron en suspensión a una concentración de esporas de $6{,}9.10^4$ esporas/ml y $7{,}3.10^4$ esporas/ml respectivamente, lo que da como concentraciones finales de inóculo las siguientes: 800 y 847 cfu/g.ss.

Este último ensayo se da por finalizado a las 4 semanas desde la inoculación y, por tanto, no se introduce en el estudio el tratamiento A(4); es decir, la aplicación del fungicida a las 4 semanas de la introducción del patógeno. Desestimamos el efecto de los tratamientos fungicidas en las últimas semanas (A(3) y A(4)), vistos los resultados de los ensayos anteriores, por lo que nos centramos en los tratamientos en momentos anteriores.

Consideramos cuatro repeticiones de los controles sanos T-T y T-A y dos repeticiones de cada uno de los demás tratamientos y de los controles inoculados con los patógenos, con un número medio de plantas por repetición de 15.

Las condiciones ambientales de la cámara de cultivo se reflejan en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4.-Cuarto ensayo. Datos de temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), humedad relativa del aire (HR) y temperatura del sustrato (Tsust) en relación a la temperatura del aire (Taire), registradas a las 09:00 horas en la cámara de cultivo en los ensayos realizados con los aislados patógenos CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *Pythium paroecandrum* inoculados sobre plantas de *Cupressus arizonica*.

ddi	Tmin.(°C)	Tmax (°C).	HR (%).	Taire(9h)	Tsust.(9h)
-7	17	21	93	18	16
0	14,5	22,5	88	20	21
7	18	24	86	23	20
14	18	23	--	22	19
21	18	23	85	21,5	19
28	17,5	23,5	71	22	21

ddi= días desde inoculación

Fluctuación durante todo el ensayo(Temperaturas en °Celsius)
Temperatura media de las maximas: 22,8±1,0
Temperatura media de las minimas: 17,2±1,4
Humedad Relativa (%): 84,6±8,2

7.3 RESULTADOS

7.3.1 PRIMER ENSAYO

7.3.1.1 Incidencia de enfermedad: Mortalidad

Las figuras 7.1 y 7.2 detallan gráficamente los valores medios de mortalidad acumulada para todos los tratamientos y su evolución en función del tiempo.

7.3.1.1.1 Mortalidad para tiempo fijo

Los valores de mortalidad acumulada se analizaron, en primer lugar, considerando la variable "tiempo" constante, y para cada valor de la misma se realizaron los correspondientes análisis de varianza y comparación de medias. Cuando se cumplieron las condiciones previas se utilizó la estadística paramétrica y la no-paramétrica en caso contrario, de la forma reseñada en el apartado 3.2.6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

El análisis estadístico considerando todos los tratamientos y controles reconoce diferencias significativas ($p<0,05$) para todos los tiempos estudiados (Tabla 7.5). Lógicamente esto se debe a la inclusión de los testigos sanos (T-T y T-A) dentro de las comparaciones.

Si, en un paso más, analizamos los distintos efectos y las posibles interacciones entre los factores ensayados encontramos que no hay diferencias en ningún caso para los datos agrupados por concentración de inóculo (Tabla 7.6). Por el contrario, en las semanas 1, 2, 3 y 6 desde la inoculación sí se detectan diferencias al nivel de significación del 5% para el momento de aplicación del fungicida (Tabla 7.6). Solo son significativas las interacciones en los datos de la primera semana (para los casos en los que se pudo estudiar estadísticamente mediante la prueba paramétrica F de Snedecor).

Los análisis de comparación de medias (Tabla 13.9.1) dan como resultados más notables los señalados a continuación.

En la primera semana (tiempo 1) los tratamientos A(-1) y A(0) son iguales entre sí y distintos a todos los demás según los tests LSD y Duncan. Los tres tests coinciden en que A(-1) y A(0) son iguales entre sí y distintos al control inoculado CA013 (Tabla 13.9.1).

En la segunda semana (tiempo 2) las diferencias entre A(-1) y A(0) con el control inoculado y el resto de tratamientos se hacen más evidentes (Tabla 13.9.1) para los tres tests utilizados. Solo en las comparaciones del tratamiento A(-1), Scheffé discrepa de los otros dos y no detecta diferencias con los demás A(i) (Tabla 13.9.1).

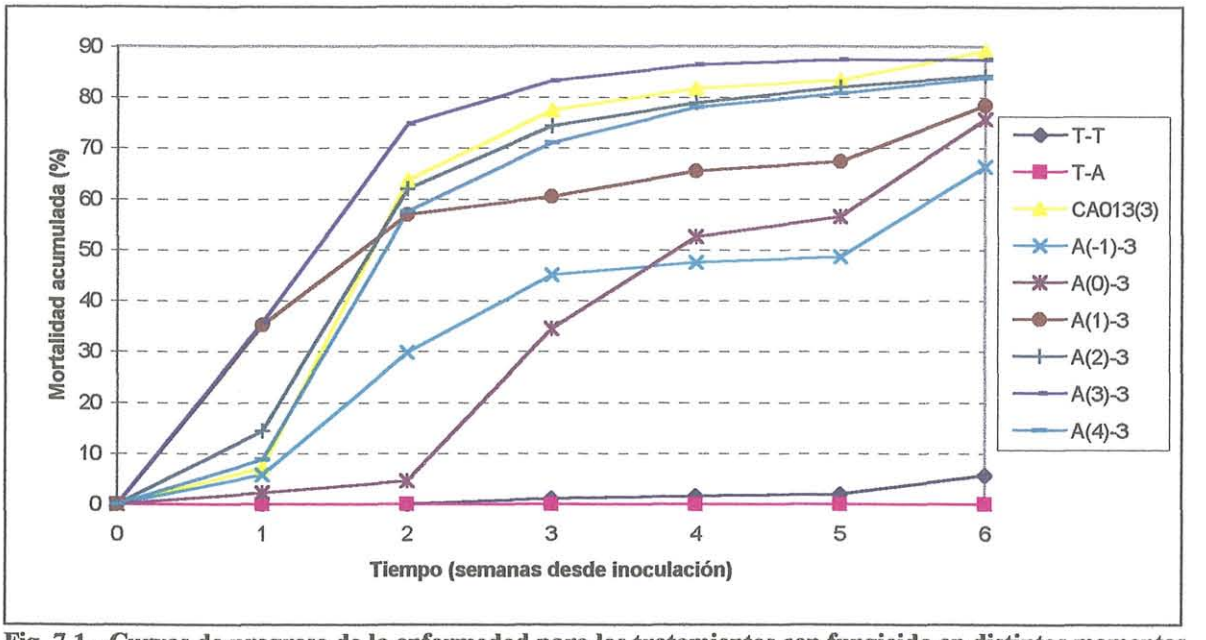


Fig. 7.1.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con CA013 a una concentración de inóculo de 3,5.104 esp/ml. Primer ensayo.

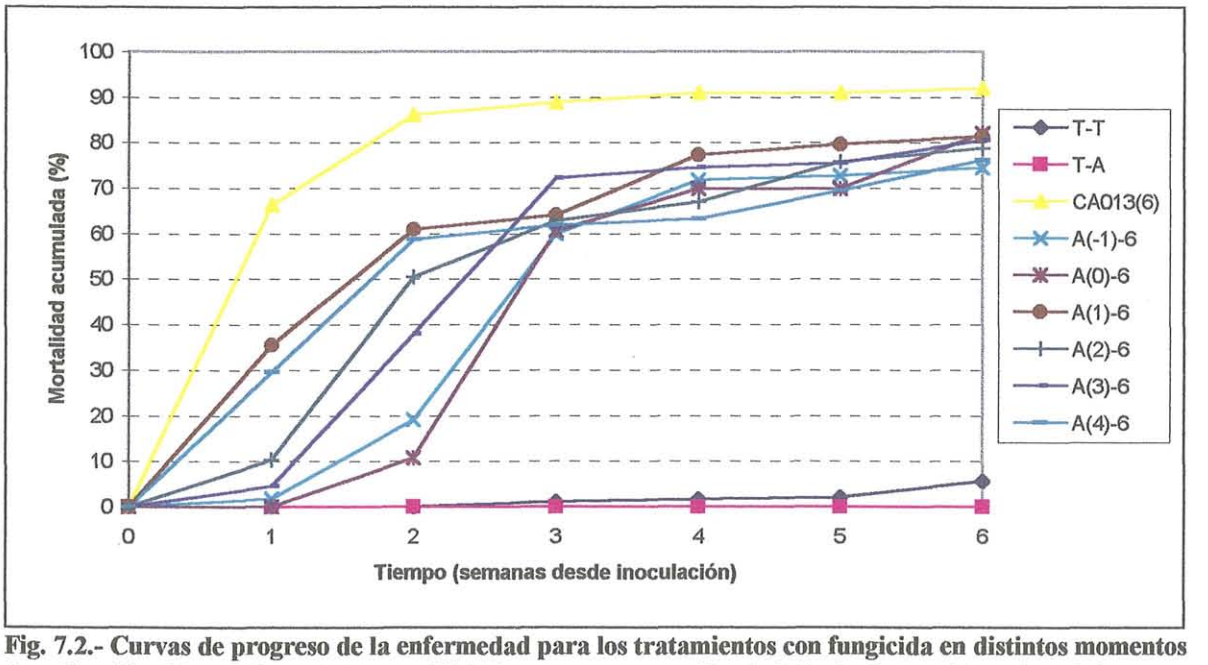


Fig. 7.2.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con CA013 a una concentración de inóculo de 6,3.104 esp/ml. Primer ensayo.

En el tiempo 3 (tercera semana desde la inoculación), A(0) no se distingue del control CA013, mientras que A(-1) y A(1) sí lo hacen (Tabla 13.9.1). Sin embargo, A(-1) no es distinto de los demás tratamientos, exceptuando al tratamiento A(3) (Tabla 13.9.1).

Por último, en la sexta semana (tiempo 6), A(-1) sigue siendo uno de los tratamientos significativamente distintos del control inoculado CA013, junto con A(1), A(2) y A(4), aunque también es distinto a los dos primeros (Tabla 13.9.1). El tratamiento A(0) es igual a todos los demás (Tabla 13.9.1).

Por tanto, las conclusiones que parecen desprenderse de los análisis de comparación de medias (Tabla 13.9.1) son solo tendencias que pueden resumirse en que los tratamientos preventivos, aplicados una semana antes de la inoculación y simultáneamente a la inoculación son los que parecen proteger algo los cultivos y que los efectos, en el caso de A(-1), aunque ligeros, persisten durante todo el período considerado en el ensayo. Las aplicaciones de fungicida posteriores no suponen ninguna mejoría en el cultivo. En cualquier caso no parece que una sola aplicación del fungicida controle la enfermedad, para las concentraciones de inóculo estudiadas.

Tabla 7.5.-Primer ensayo. Valores del Análisis de varianza según los tests de Kruskal-Wallis o F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con el aislado CA013 de *P.irregulare* para las dos concentraciones de inóculo, incluyendo en el análisis los controles sin inóculo, sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Variable: mortalidad acumulada		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(15,20) ó H(15,36)**	**p**
1	18,25169	0,000000
2	26,52462	0,000000
3*	21,37012	0,011100
4*	21,61170	0,010200
5*	21,45065	0,010800
6*	20,72938	0,013900

*No cumplen las hipótesis previas por lo que se analizan según Kruskal-Wallis.

Tabla 7.6.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida referido al momento de la inoculación y de la interacción entre ambos factores. Valores de los estadísticos según los tests de Kruskal-Wallis o F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada. Se excluyen del análisis los controles no inoculados con el hongo. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Factor: Concentración de inóculo		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(1,14) ó H(1,28)	p
1	0,62452	0,44255
2	0,43523	0,52014
3*	0,00845	0,92680
4*	0,61711	0,44522
5	0,74625	0,40222
6*	0,30409	0,58130

Factor: Momento de aplicación del fungicida		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,14) ó H(6,28)	p
1	12,17827	0,00007
2	15,22339	0,00002
3*	13,39098	0,03730
4*	11,75335	0,06770
5	2,08681	0,12046
6*	12,69621	0,04820

Factor: Interacción		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,14)	p
1	9,36288	0,00031
2	2,08913	0,12012
3*	----	----
4*	----	----
5	1,29268	0,32231
6*	-----	-----

*No cumplen las hipótesis previas por lo que se analizan según Kruskal-Wallis.

7.3.1.1.2 Comparación de las AUDPC

La variable AUDPC se calculó a partir de las curvas de progreso de enfermedad (Fig.7.1 y Fig.7.2), a su vez construidas con los valores de mortalidad acumulada en función del tiempo transcurrido desde el momento de la inoculación y a lo largo de las 6 semanas posteriores.

Con el estudio estadístico de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) evaluamos, en primer lugar, las diferencias entre los tratamientos fungicidas, los testigos inoculados en ausencia de fungicida y los controles sin inóculo (término que incluye tanto al testigo total T-T, como el testigo tratado con el fungicida pero sin ser inoculado con el hongo T-A); y esto para las dos concentraciones del inóculo de CA013 aplicadas.

Después de la preceptiva comprobación de las hipótesis previas exigidas para la aplicación del análisis de varianza F de Snedecor (lo que se consigue después de transformar los datos de porcentaje de la manera habitual (apdo.3.2.6.2)), se confirma la existencia de diferencias entre los controles sanos y el resto de los tratamientos ($F(15,20)=41,88834$; $p=0,00000$); hecho claramente deducible también de la observación gráfica de las curvas (Figs.7.1 y 7.2). La comparación múltiple de medias por Duncan (Tabla 7.7) deja clara la diferencia entre los tratamientos y los controles sin inóculo, mientras que los valores menores

de la AUDPCstd se consiguen con las aplicaciones del fungicida en los primeros momentos (en el mismo momento de la inoculación y una semana antes de la inoculación con el patógeno). El test de Scheffé, más exigente para aceptar diferencias (Tabla 7.8) incide en las tendencias avanzadas por Duncan, aunque no detecta diferencias entre los tratamientos A(-1) y A(0) y sus respectivos controles inoculados.

Dada la complejidad para extractar conclusiones claras de estos análisis, procedimos a realizar el análisis de las interacciones entre los dos factores ensayados: la concentración del inóculo y el momento de aplicación del fungicida. Las Tablas 7.9 y 13.9.2 muestran los valores del estadístico F y la probabilidad "p" para ambos factores y su interacción. Según esto el efecto principal es el momento de aplicación del fungicida. La distinta concentración del inóculo aplicado no entraña diferencias en el comportamiento del fungicida. Tampoco se detectan interacciones entre los factores, por lo que se optó por estudiar los datos atendiendo únicamente al factor principal.

Los resultados de la comparación de medias con los datos agrupados de esta manera (Tabla 7.10) confirman las tendencias que apuntábamos antes: los valores menores de la variable corresponden a los tratamientos A(-1) y A(0), es decir, a las aplicaciones de fungicida en la semana previa a la inoculación y simultáneamente a ella, y son significativamente distintos ($p<0,05$) al resto de los tratamientos. La Tabla 13.9.3 recoge los valores de la probabilidad para los pares de comparaciones entre tratamientos. El control sano T-T es distinto de todos los tratamientos A(i) y, por supuesto, del control inoculado CA013.

Tabla 7.7.-Primer ensayo. Comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd), calculada a partir de los valores de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con el aislado CA013 de *P.irregulare* y para dos concentraciones de inóculo sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes según Duncan (p> 0,05).

	AUDPCstd (%)	
Tratamiento	P.irregulare ($3,5.10^4$ esp/ml)	P.irregulare ($6,3.10^4$ esp/ml)
T-T	1,25± 0,30 a	
T-A	0,00±0,00 a	
CA013	59,64± 1,83 def	78,21± 3,73 g
A(-1)	34,99± 9,77 bc	43,78± 3,18 bcd
A(0)	31,36± 0,22 b	41,99± 17,68 bcd
A(1)	54,09± 6,50 def	56,69± 1,67 def
A(2)	58,96± 1,30 def	50,95± 1,58 cdef
A(3)	68,52± 1,15 efg	50,86± 1,11 cde
A(4)	56,35± 3,34 def	53,50± 2,15 def

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero con aplicación de fungicida; CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 7.8.-Primer ensayo. Comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd), calculada a partir de los valores de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con el aislado CA013 de *P.irregulare* y para dos concentraciones de inóculo sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes según Scheffé (p> 0,05).

	AUDPCstd (%)	
Tratamiento	P.irregulare ($3{,}5.10^4$ esp/ml)	P.irregulare ($6{,}3.10^4$ esp/ml)
T-T	1,25± 0,30 a	
T-A	0,00±0,00 a	
CA013	59,64± 1,83 bc	78,21± 3,73 c
A(-1)	34,99± 9,77 b	43,78± 3,18 bc
A(0).	31,36± 0,22 b	41,99± 17,68 bc
A(1)	54,09± 6,50 bc	56,69± 1,67 bc
A(2)	58,96± 1,30 bc	50,95± 1,58 bc
A(3)	68,52± 1,15 bc	50,86± 1,11 bc
A(4)	56,35± 3,34 bc	53,50± 2,15 bc

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero con aplicación de fungicida; CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 7.9.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente: AUDPCstd	
	F	p
Concentración	0,516733	0,484065
Aplicación fungicida	7,124019	0,001233*
Interacción	2,146187	0,112171

Tabla 7.10.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo y del momento de aplicación del fungicida sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD y Duncan.

Factor: Momento de aplicación del fungicida	AUDPCstd (%)
CA013	68,93±5,62 a
A(-1)	39,39±4,91 c
A(0)	36,68±7,85 c
A(1)	56,89±3,18 ab
A(2)*	54,96±2,46 b
A(3)	59,69±5,14 ab
A(4)*	54,93±1,82 b

Factor: concentración de inóculo	AUDPCstd (%)
CA013 ($3{,}5.10^4$ esp/ml)	51,99±3,74 a
CA013 ($6{,}3.10^4$ esp/ml)	54,14±3,68 a

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. "*"Según Scheffé los únicos tratamientos distintos del control son A(-1) y A(0) sin diferencias entre ellos.

7.3.1.2 Recuperación de patógeno

Se reaisló el patógeno inoculado del 100% de las plantas analizadas y el 0% de los controles sin inocular. Debido al carácter de estos datos no se han evaluado estadísticamente, pero queda claro que el fungicida no ha evitado la penetración del hongo en el sistema radicular de las plantas.

7.3.1.3 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes y pesos frescos y secos

7.3.1.3.1 Longitudes de raíz principal y tallo

Con estas variables se actuó de forma similar a la propuesta para la variable AUDPCstd, se estudian los efectos principales y las posibles interacciones. Todas las variables cumplieron con las hipótesis de normalidad y homoscedasticidad sin necesidad de transformación, con la sola excepción del peso fresco de parte aérea, que las cumplió después de una transformación logarítmica del tipo $y = \log(10(x+1))$. Los valores medios de ambas variables para todos los tratamientos y los controles se expresan gráficamente en las figuras 7.3 y 7.4.

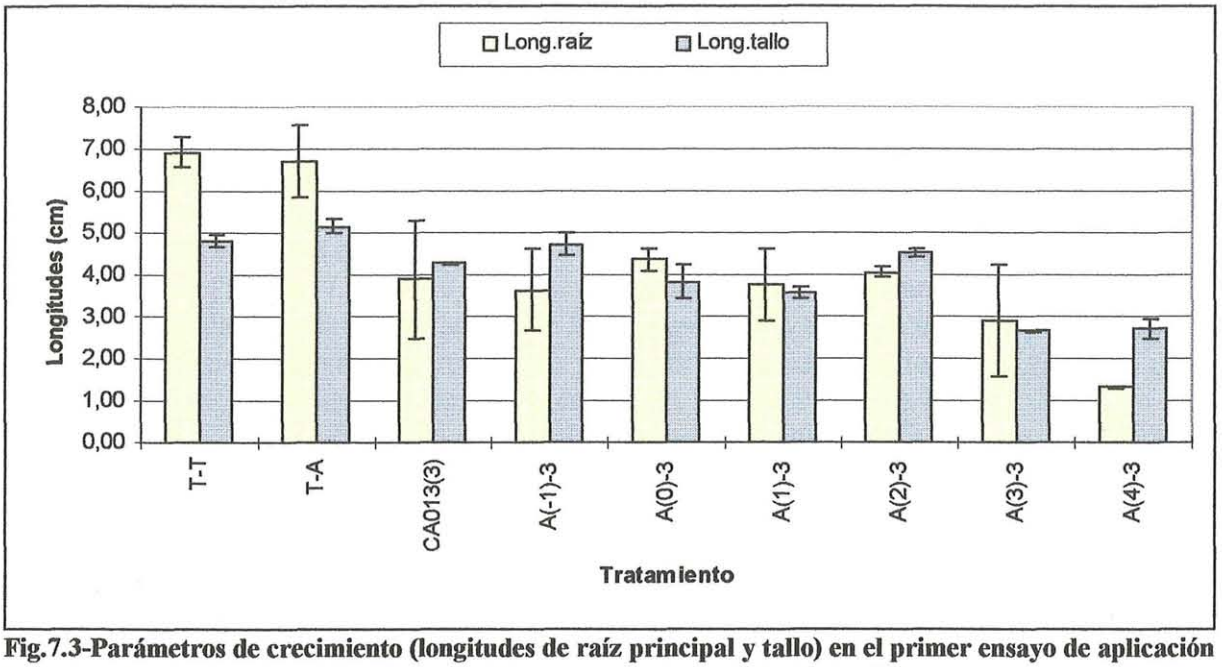


Fig.7.3-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el primer ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013 a una concentración de inóculo de 3,5.104 esp/ml.

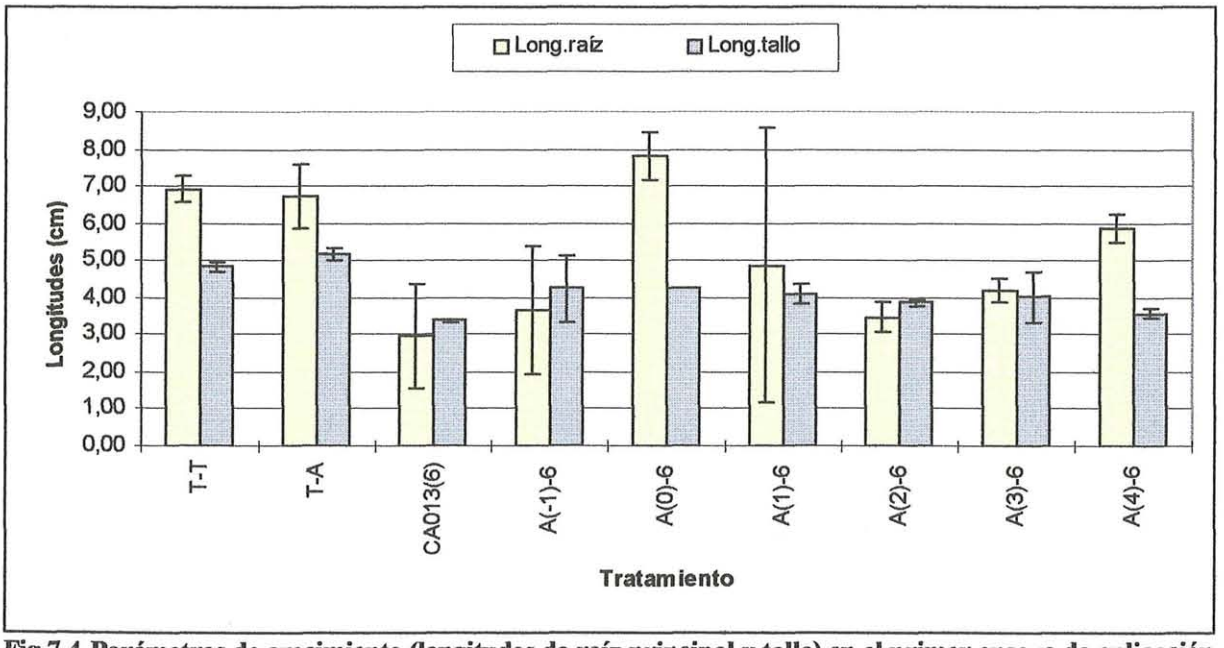


Fig.7.4-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el primer ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013 a una concentración de inóculo de 6,3.104 esp/ml.

Según la prueba F de Snedecor solo existen diferencias significativas al nivel del 5% para la variable "longitud de tallo" si se considera el efecto del momento de aplicación del fungicida (Tablas 7.11 y 7.12). No se aprecian interacciones entre ambos factores para ninguna de las variables (Tabla 7.11). Tampoco aquí parece haber diferencias entre las dos concentraciones del hongo ensayadas (Tablas 7.11 y 7.12).

Según esto, estudiamos con más detalle la relación significativa mediante los tests de comparación múltiple de medias LSD, Duncan y Scheffé, encontrando que no hay diferencias significativas entre los controles inoculados y no tratados con fungicida y los tratamientos con el fungicida (Tablas 7.12 y 13.9.5). Las longitudes de tallo menores corresponden a las aplicaciones de fungicida más tardías, en las semanas 3 y 4 desde la inoculación (Tabla 7.12), pero con relativas diferencias frente a las primeras aplicaciones. El test de Scheffé no detecta ninguna diferencia al nivel de significación del 5% (Tablas 7.12 y 13.9.5).

Tabla 7.11.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Concentración	3,36332	0,08801	0,69171	0,41954
Aplicación fungicida	1,04994	0,43554	3,32154	0,03008*
Interacción	1,27279	0,33043	2,74532	0,05603

Tabla 7.12.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo y del momento de aplicación del fungicida sobre las longitudes de raíz principal y tallo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD y Duncan.

Factor: concentración de inóculo	Longitud de raíz principal (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
CA013 ($3,5.10^4$ esp/ml)	3,42±0,36 a	3,76±0,22 a
CA013 ($6,3.10^4$ esp/ml)	4,69±0,62 a	3,92±0,16 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Longitud de raíz principal (cm.)	Longitud de tallo (cm.)*
CA013	3,42±0,94 a	3,82±0,44 abc
A(-1)	3,66±0,47 a	4,48±0,18 a
A(0)	6,09±1,81 a	4,05±0,24 ab
A(1)	4,31±0,50 a	3,84±0,17 abc
A(2)	3,76±0,23 a	4,20±0,34 a
A(3)	3,56±0,69 a	3,34±0,40 bc
A(4)	3,60±1,36 a	3,14±0,33 c

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. "*" Según Scheffé no hay diferencias significativas en ningún caso al nivel de significación del 5%.

7.3.1.3.2 Pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea.

Las figuras 7.5 y 7.6 recogen las medias de todos los tratamientos para las cuatro variables. Todas ellas cumplieron las condiciones previas del ANOVA F paramétrico sin necesidad de transformación.

Resultados semejantes a los recogidos en el punto anterior se obtuvieron con los datos de pesos frescos y secos de sistema radicular y parte aérea. El análisis estadístico no detectó diferencias significativas (p< 0,05) en ambos factores para ninguna de las variables, así como tampoco interacciones significativas (Tablas 7.13, 7.14, 7.15 y Tablas 13.9.6 y 13.9.7).

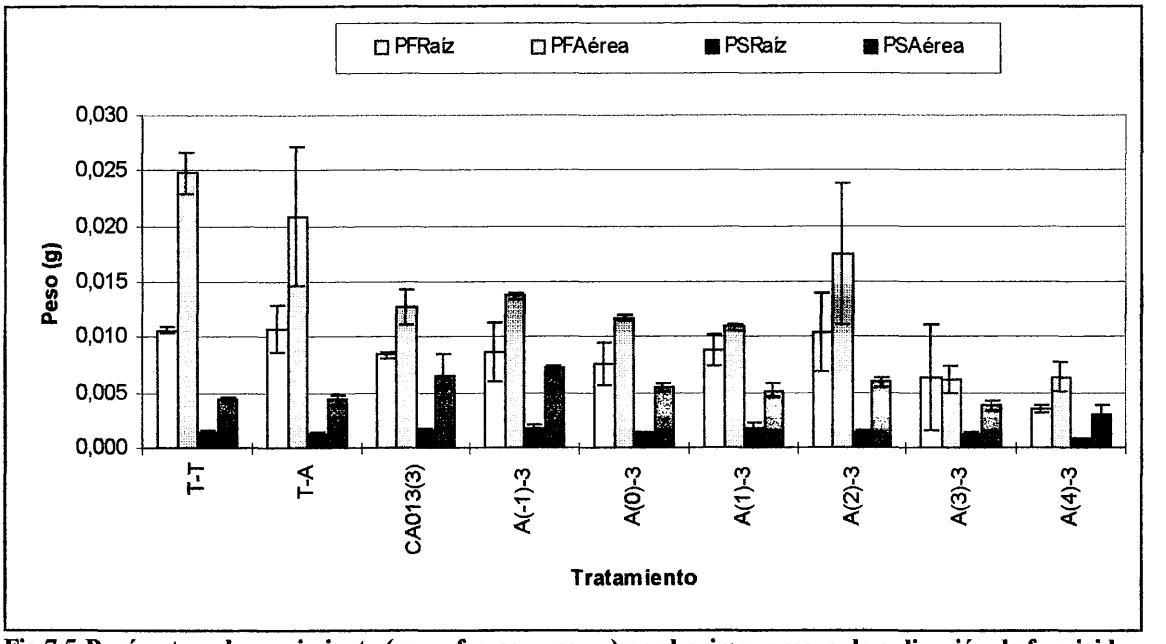


Fig.7.5-Parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) en el primer ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013 a una concentración de inóculo de 3,5.104 esp/ml.

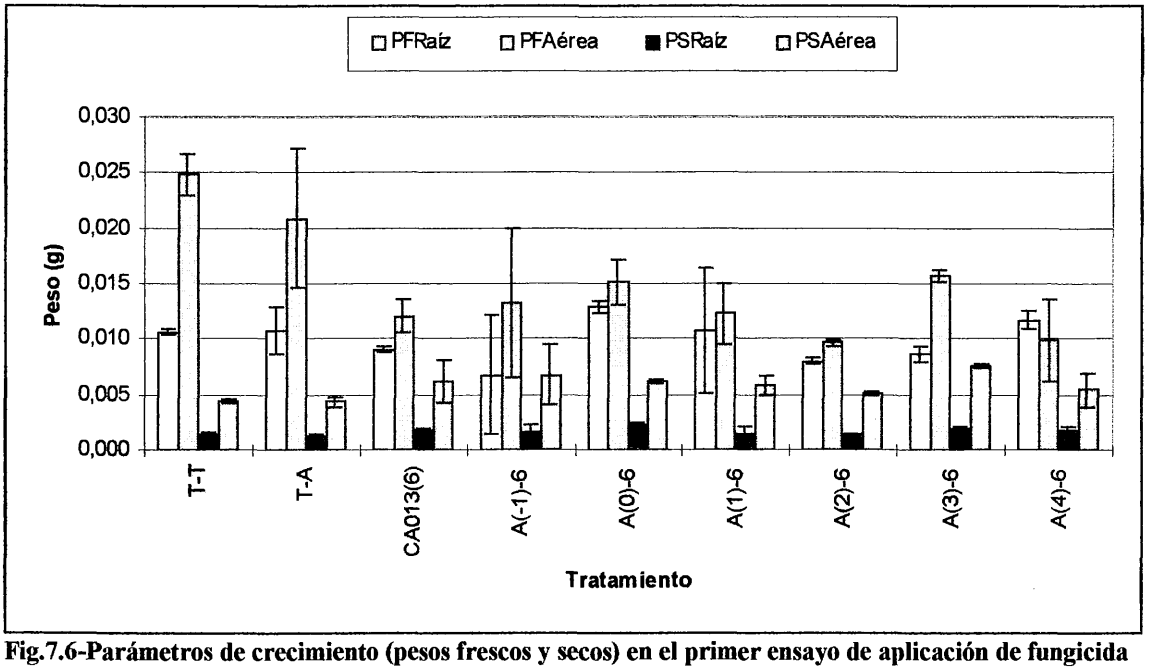


Fig.7.6-Parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) en el primer ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013 a una concentración de inóculo de 6,3.104 esp/ml.

Para concretar, parece que el fungicida no ha controlado la enfermedad. En general los tratamientos no igualan a los controles sanos para ambas concentraciones en la variable "longitud de tallo". En "longitud de raíz" la mayor media corresponde a A(0)-6 (por otra parte igual a los controles T-T y T-A) y A(1)-6 con gran variabilidad. No hay ninguna diferencia en los pesos, el fungicida no protege. Algunos de los tratamientos presentan una elevada variabilidad.

Tabla 7.13.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos). Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Concentración	1,59427	0,22734	0,66242	0,42933
Aplicación fungicida	0,28333	0,93533	0,92212	0,50864
Interacción	0,80724	0,58096	1,68062	0,19827

Factor	Variable dependiente			
	Peso seco raíz		Peso seco parte aérea	
	F	p	F	p
Concentración	3,04813	0,10273	2,00797	0,17834
Aplicación fungicida	0,50971	0,79132	1,16245	0,37916
Interacción	0,85085	0,55253	1,17604	0,37281

Tabla 7.14.-Primer ensayo. Efecto de la concentración de inóculo y del momento de aplicación del fungicida sobre los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes al final del ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: concentración de inóculo	Peso fresco de raíz (g)	Peso fresco de parte aérea (g)
CA013 ($3,5.10^4$ esp/ml)	0,00768±0,00092 a	0,01131±0,00125 a
CA013 ($6,3.10^4$ esp/ml)	0,00969±0,00107 a	0,01256±0,00106 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Peso fresco de raíz (g)	Peso fresco de parte aérea (g)
CA013	0,00874±0,00209 a	0,01241±0,00628 a
A(-1)	0,00769±0,00123 a	0,01349±0,00087 a
A(0)	0,01025±0,00286 a	0,01343±0,00148 a
A(1)	0,00979±0,00082 a	0,01159±0,00044 a
A(2)	0,00921±0,00164 a	0,01357±0,00346 a
A(3)	0,00749±0,00207 a	0,01089±0,00319 a
A(4)*	0,00764±0,00276 a	0,008163±0,00117 a

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

El estudio de las posibles interacciones para los tiempos comunes, excluyendo los controles sin inóculo (T-T y T-A), detecta interacciones entre los factores en los tiempos 3, 4, 6 y 9 (Tabla 7.17). En el tiempo 2 hay diferencias entre ambos hongos inoculados (Tabla 7.17); sin embargo, no se aprecian efectos debidos al momento de aplicación del fungicida para ningún tiempo (Tabla 7.17).

Del estudio de los datos de mortalidad registrados semanalmente, desde el momento de la inoculación (tiempo 0) hasta la novena semana desde la inoculación (tiempo 9), para los dos inóculos por separado, se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 7.16.-Segundo ensayo. Valores del Análisis de varianza según el test F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum*, incluyendo en el análisis los controles sin inóculo, sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Hongo inoculado: *P.irregulare* (CA013)		
Variable: mortalidad acumulada		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(8,18)**	**p**
1	2,089010	0,092653
2	2,048663	0,098402
3	4,139957	0,005873
4	3,637929	0,010888
5	4,228929	0,005284
6	5,150007	0,001880
9	11,807245	0,000009

Hongo inoculado: *P.paroecandrum* (CL039)		
Variable: mortalidad acumulada		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(8,18)**	**p**
1	5,871271	0,000897
2	23,993995	0,000000
3	24,942317	0,000000
4	23,682920	0,000000
5	15,481392	0,000001
6	16,028860	0,000001
7	16,352539	0,000001
8	10,242391	0,000025
9	11,549997	0,000011

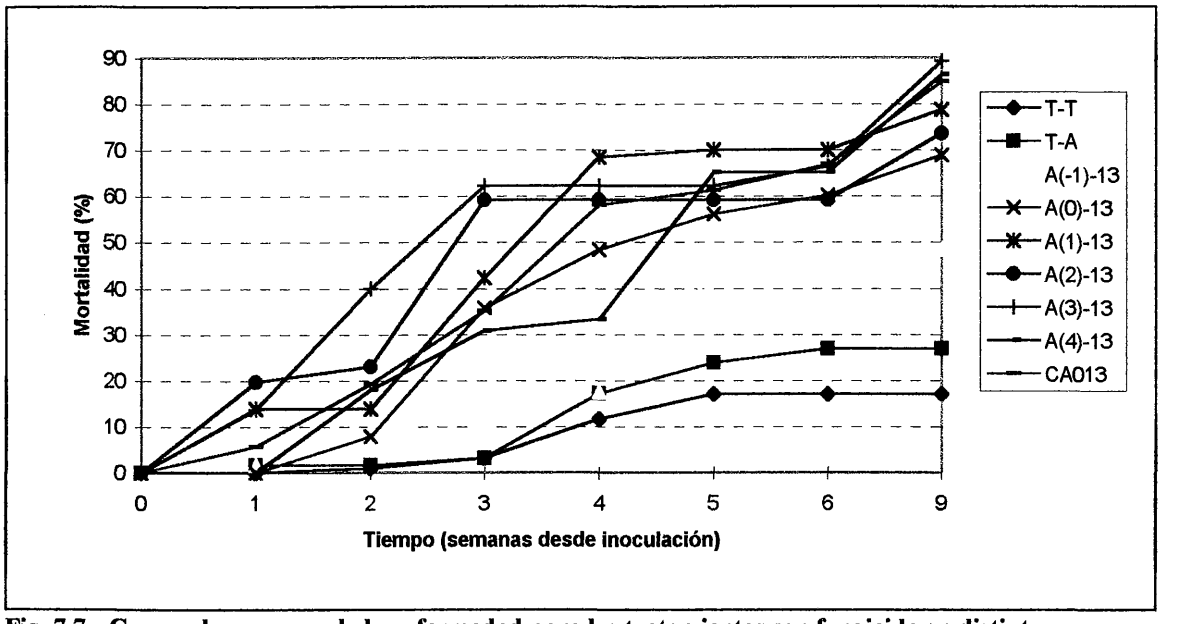


Fig. 7.7.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con el aislado CA013. Segundo ensayo.

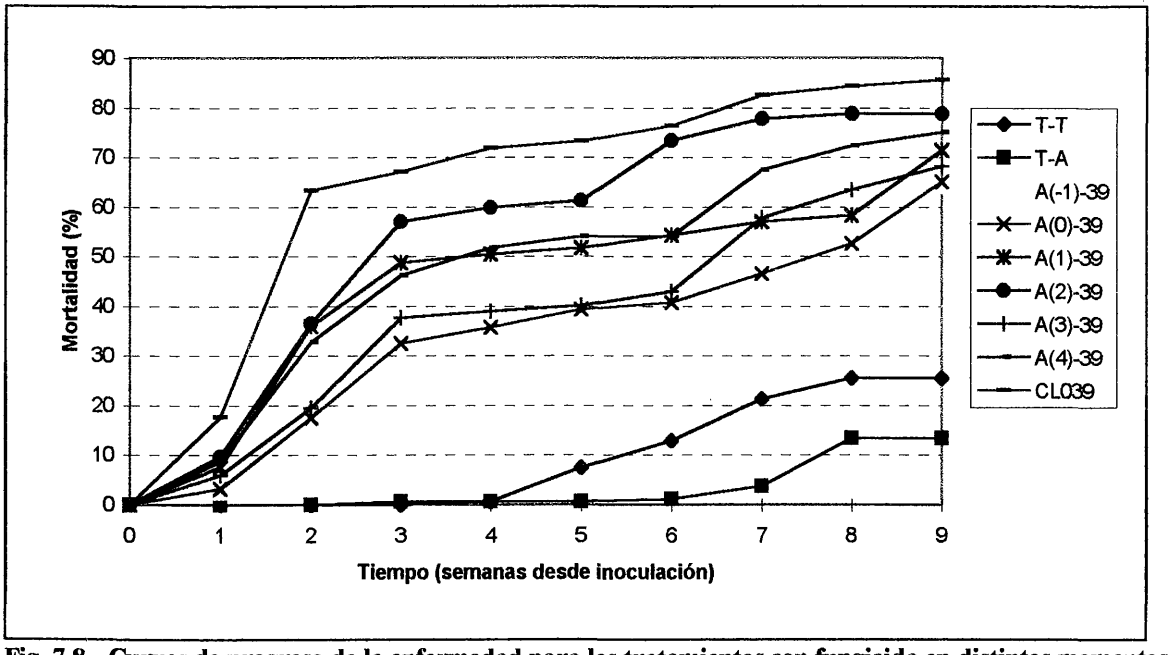


Fig. 7.8.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con el aislado CL039. Segundo ensayo.

Tabla 7.17.-Segundo ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida referido al momento de la inoculación y de la interacción entre ambos factores. Valores de los estadísticos según los tests de Kruskal-Wallis o F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada. Se excluyen del análisis los controles no inoculados con el hongo. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Factor: Hongo inoculado		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(1,28) ó H(1,42)	p
1*	2,19205	0,138700
2	8,617589	0,006583
3	1,251801	0,272715
4	0,004551	0,946692
5	4,157605	0,050988
6	3,045170	0,091945
9	1,201177	0,282423

Factor: Interacción		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,28)	p
1*	-------	-------
2	2,391029	0,054336
3	3,637438	0,008547
4	3,811209	0,006685
5	2,396142	0,053911
6	2,810607	0,028703
9	2,599457	0,039510

Factor: Momento de aplicación del fungicida		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,28) ó H(6,42)	p
1*	4,942110	0,551300
2	1,634446	0,174702
3	0,804109	0,575207
4	1,479356	0,221323
5	1,331284	0,276446
6	1,396364	0,250832
9	1,966135	0,104707

*No cumplen las hipótesis previas por lo que se analizan según Kruskal-Wallis.

7.3.2.1.1.1 P.irregulare (CA013)

Como ya se ha mencionado, en las primeras dos semanas desde la inoculación con este patógeno (tiempos 1 y 2), los datos recogidos cumplen las condiciones previas del ANOVA F. Esta prueba no detecta diferencias significativas (p>0,05) entre los tratamientos, incluidos todos los controles (Tabla 7.16).

Los resultados de los análisis en el tiempo 3 (tercera semana desde la inoculación) comienzan a mostrar diferencias entre los tratamientos (Tabla 13.9.8). Las comparaciones de medias mediante los tests de Duncan y de Scheffé no las detectan (Tabla 13.9.8). Solamente con LSD somos capaces de reconocerlas (Tabla 13.9.8).

Los hechos más notorios son los siguientes: el control total (T-T) no se diferencia del control tratado con el fungicida (T-A) y tampoco se distingue del tratamiento A(-1). Por lo demás T-T es distinto a todos los demás, excepto del tratamiento A(4) que ha registrado una

Las diferencias para el momento de aplicación del fungicida no se mantienen durante la segunda semana (tiempo 2) según el ANOVA F (Tabla 7.17). El efecto principal es el hongo inoculado (Tabla 7.17); no hay interacciones entre ambos factores (Tabla 7.17). Al introducir los controles sanos en el análisis no se detectan diferencias significativas ($p<0,05$) entre los tratamientos inoculados con el aislado CA013, mientras que sí se detectan con el aislado CL039 (Tabla 7.16). En los datos de esta semana todos los tests de comparación de medias las señalan también. Todos los tratamientos inoculados con el patógeno, tratados o no con el fungicida, son distintos a los controles sanos, tanto a T-T como a T-A que, por otro lado, son iguales entre sí (Tabla 13.9.9).

En la tercera semana (tiempo 3) los datos también cumplen las condiciones previas del ANOVA F, cuya aplicación para el análisis de todos los tratamientos en conjunto señala la existencia de diferencias significativas al 5% (Tabla 7.16).

Duncan y Scheffé dan el mismo resultado: los controles sin inocular T-T y T-A son iguales entre si y distintos a todos los demás (Tabla 13.9.8). Todos los grupos tratados con el fungicida son iguales entre sí e iguales al control inoculado, con la única excepción de A(-1) que se diferencia de CL039 (Tabla 13.9.8). Con ello parece que comienza a apreciarse un ligero efecto protector por parte de la aplicación del fungicida una semana antes de la inoculación A(-1).

El test LSD corrobora estos resultados y además, añade que el control inoculado CL039 es distinto a los tratamientos A(-1), A(0), A(3) y A(4) (Tabla 13.9.8). El tratamiento A(-1) es distinto de A(1), A(2) y A(4), aparte de ser distinto del control inoculado y de los controles sin inocular (Tabla 13.9.8). Por su parte, A(0) es distinto del control inoculado y de A(2) pero igual a A(-1) (Tabla 13.9.8).

En la cuarta semana (tiempo 4), la situación es similar a la semana anterior. Las comparaciones de medias por Duncan y Scheffé repiten las mismas diferencias (Tabla 13.9.8). Para LSD el control inoculado CL039 solo es igual a A(2) y A(4) (Tabla 13.9.8). El tratamiento preventivo A(-1) solo es igual a A(0) y A(3) (Tabla 13.9.8). Asimismo, los tratamientos A(-1), A(0), A(1) y A(3) son distintos al control inoculado, pero también distintos a los controles sanos T-T y T-A (Tabla 13.9.8).

En la semana quinta (tiempo 5), según Duncan, el control T-T es igual a T-A y ambos son distintos a todos los demás tratamientos. El resto de los tratamientos son iguales entre sí (Tablas 7.17 y 13.9.9).

Según Scheffé los tratamientos A(-1), A(0) y A(1) son iguales a T-T, aunque solo A(0) es igual a T-A (Tabla 13.9.9). El tratamiento A(-1) es igual a todos los tratamientos, tanto sanos (Tabla 13.9.9) como inoculados (Tabla 7.17). El control inoculado CL039 es igual a todos los tratamientos inoculados (Tabla 7.17). Para LSD se sigue cumpliendo la norma de que T-T es igual a T-A y distintos a todos los demás (Tabla 13.9.9).

En el tiempo 6 (sexta semana desde la inoculación), Duncan es casi tan exigente con las desigualdades como Scheffé y solo considera a ambos controles sanos distintos entre sí y distintos de todos los demás tratamientos (Tabla 13.9.8). El tratamiento A(3) se encuentra al límite de igualdad o desigualdad con T-T (Tabla 13.9.8).

En este momento el control total T-T ha alcanzado una mortalidad acumulada media superior al 10%, y por ello Scheffé no detecta diferencias significativas entre T-T y ciertos tratamientos con el fungicida, tales como A(-1), A(0), A(1), A(3) y A(4) (Tabla 13.9.8). Todos los grupos tratados con el fungicida son iguales entre si e iguales al control inoculado (Tabla 13.9.8).

Para LSD el control inoculado CL039 es distinto de los sanos y de A(-1), A(0) y A(3) solamente (Tabla 13.9.8). Parece, por tanto, que estos tratamientos han proporcionado cierta protección frente a la enfermedad, aunque los tres siguen siendo distintos también a los controles sanos (Tabla 13.9.8). Los tres son además distintos a A(2) que es el de mortalidad superior.

En el tiempo 7 (semana 7) para LSD y Duncan los controles sanos son diferentes entre sí y distintos a todos los demás (Tabla 13.9.8). Todos los tratamientos que llevan inóculo son iguales entre sí (Tabla 13.9.8).

Scheffé repite el resultado de la semana anterior con la única salvedad de que T-T no solo es distinto de A(2) y del control CL039, sino que se distingue también de A(4) (Tabla 13.9.8). Según LSD, los tratamientos A(-1), A(0), A(1) y A(3) son distintos al control inoculado y al tratamiento A(2) pero iguales al resto (excluyendo los controles sanos) (Tabla 13.9.8).

En la octava semana (tiempo 8) tanto T-T como T-A han sufrido muchas bajas debido a la falta de espacio en los contenedores y dado el desarrollo que han experimentado las plantas sanas. Por esta razón, las diferencias con los tratamientos en algunos casos disminuyen, y estas alteraciones se detectan en los análisis estadísticos. Por ejemplo, Duncan sigue considerando a todos los tratamientos inoculados iguales entre sí y distintos al control T-A, pero el control T-T es igual a algunos de ellos, A(-1) y A(3) aunque con probabilidades bajas (p=0,06 y p=0,08) (Tabla 13.9.8). Scheffé, más exigente, no detecta diferencias ente T-T y todos los tratamientos, con excepción de A(2) y el control inoculado CL039 (Tabla 13.9.8). Por su parte, T-A es igual a A(0) y A(1) solamente (Tabla 13.9.8).

El test LSD compara las medias y deduce que ambos controles sanos son distintos al resto e iguales entre sí (Tabla 13.9.8). Los tratamientos A(-1), A(0) y A(1) son distintos al control inoculado CL039 (Tabla 13.9.8). El tratamiento A(0) es también distinto a A(2).

En la última semana del ensayo (tiempo 9), Duncan repite el resultado de la semana anterior solo variando que, en este tiempo 9, los tratamientos A(-1) y A(3) son distintos a T-T (Tabla 13.9.8). Scheffé repite el resultado de la semana 7 (Tabla 13.9.8).

El test LSD solo detecta diferencias entre el tratamiento A(-1) y el control inoculado CL039 (p=0,0418) (Tabla 13.9.8), y ligerísimas diferencias entre el tratamiento A(0) y el control CL039 (p=0,04718) (Tabla 13.9.8). Por lo demás, se repite la igualdad entre T-T y T-A y su diferencia con respecto a todos los demás tratamientos (Tabla 13.9.8).

mortalidad muy reducida hasta este momento y constituye una anomalía frente a lo esperado (Tabla 13.9.8).

Por su parte, A(-1) tampoco se diferencia de A(0), ni de A(1) ó A(4) cuya mortalidad ha sido muy reducida (Fig.7.7). Además el control inoculado con CA013 es significativamente distinto de T-T y T-A e igual al resto (Tabla 13.9.8). No hay diferencias que reseñar en el resto de los tratamientos.

Parece que durante esta tercera semana es cuando el patógeno ha comenzado a afectar al huésped de una forma evidente y es cuando empieza a apreciarse cierta protección del tratamiento preventivo realizado una semana antes de aplicar el patógeno al suelo A(-1), aunque levemente.

Durante la semana siguiente (tiempo 4), la prueba ANOVA F detecta diferencias significativas (p=0.011) (Tabla 7.15), pero ni Duncan ni Scheffé encuentran diferencias.
En éste punto es interesante destacar que la mortalidad en los controles sanos, no debida al inóculo (como se comprobó adecuadamente mediante la técnica de recuperación de patógeno que resultó negativa) ha sido elevada (superior al 10% para T-T y algo inferior al 20% para T-A) y este hecho ha podido influir en el análisis (Fig.7.7).

Según el test LSD se refuerza la idea de que T-T y T-A no se diferencian entre sí ni al ser comparados con A(-1) y, además, tanto T-A como A(-1) son iguales a A(0) (Tabla 13.9.8). Sin embargo, el tratamiento A(0) no se diferencia significativamente del control inoculado ni del resto de los grupos tratados con el fungicida (Tabla 13.9.8). Por el contrario, A(-1) es distinto a CA013 y a todos los tratamientos con fungicida, excepto A(0) y A(4), que presenta en este momento una mortalidad muy escasa. CA013 es igual a todos los tratamientos con excepción de ambos controles sanos y A(-1) (Tabla 13.9.8).

En el tiempo 5 (quinta semana desde la inoculación) la prueba ANOVA F detecta diferencias significativas entre todos los tratamientos solo cuando se introducen los controles sanos en el análisis (Tablas 7.5 y 7.6). Los tests de comparación múltiple de medias Duncan y Scheffé no señalan ninguna diferencia al nivel de significación del 5% (Tabla 13.9.9).

Sin embargo, el test LSD, incide en resultados similares a los de semanas anteriores: T-T es igual a T-A y ambos son iguales a A(-1) (Tabla 13.9.9). Tanto T-T como T-A son distintos a todos los demás tratamientos (desde A(0) hasta A(4) y CA013) (Tabla 13.9.9). Según todo esto, la novedad está en que A(-1) no se diferencia de ningún tratamiento, ya sean controles sanos T-T y T-A, control inoculado CA013 o grupos tratados con el fungicida en los distintos momentos. Todos los tratamientos inoculados y regados con el fungicida son iguales entre sí y con el inóculo.

De acuerdo con al ANOVA F, también hay diferencias entre tratamientos para el tiempo 6 (sexta semana desde la inoculación). En esta ocasión los tres tests de comparación múltiple de medias las detectan (Tabla 7.16).

Con los tres tests vuelve a repetirse la igualdad entre T-T y T-A (Tabla 13.9.8). De la aplicación de LSD se deduce que ambos testigos sanos son distintos a todos los demás tratamientos, con la sola excepción de A(-1) que no se diferencia de T-A (Tabla 13.9.8). El

control inoculado (CA013) no se diferencia de ninguno de los tratamientos con el fungicida, ni estos se diferencian entre sí. Parece que no hay control de la enfermedad por parte del fitosanitario para este momento. La situación más favorable podría darse con A(-1), recordemos que no se diferencia de T-A, aunque hay que tener en cuenta que la mortalidad sufrida por el control en este tiempo es anormalmente elevada (Fig.7.7).

Según Scheffé solo A(1), que es el que alcanza mayor mortalidad en este momento, se diferencia de T-T (el de menor mortalidad) pero con una significación muy reducida (p=0,0473), por lo que no se considera relevante. No hay diferencias entre los demás (Tabla 13.9.8).

Duncan no detecta diferencias entre A(-1) y A(0) y el resto de los tratamientos, tanto controles sanos como inoculados (Tabla 13.9.8). Por otra parte, el control T-T se diferencia solamente de A(2), A(4) y del control inoculado. El control T-A no se diferencia de ninguno (Tabla 13.9.8).

Y, por fin, los resultados del análisis estadístico de los datos recogidos al final de la novena semana (tiempo 9) también se evaluaron mediante el ANOVA F de Snedecor que señaló diferencias significativas al 5% (Tabla 7.16).

Los tres tests de comparación de medias coinciden de nuevo en que no hay diferencias entre T-T y T-A (Tabla 13.9.8). Para Duncan y Scheffé la media de A(-1) no se diferencia de ambos controles, aunque tampoco del control inoculado CA013 (Tabla 13.9.8). Para LSD, T-A no es distinto de A(-1) pero T-T sí lo es (Tabla 13.9.8).

Según LSD, A(-1) tiene efectos similares a A(0) y es distinto al resto de los tratamientos inoculados, pero según Duncan A(-1) solo se diferencia de A(3). Para Scheffé no se diferencia de ningún tratamiento, ni inoculados ni sanos (Tabla 13.9.8).

Por lo demás, lo más destacado es que A(-1) es distinto del inóculo aplicando el test LSD, lo que puede indicar un cierto efecto protector de dicho tratamiento preventivo si se considera la mortalidad acumulada final (al cabo de 9 semanas desde la inoculación) (Tabla 13.9.8). Sin embargo , según los otros dos tests el control inoculado solo es distinto a los controles sanos T-T y T-A (Tabla 13.9.8).

7.3.2.1.1.2 P.paroecandrum (CL039)

A diferencia de lo que ocurre con CA013, los tratamientos inoculados con CL039 comienzan a presentar diferencias significativas, al nivel de significación del 5%, desde la primera semana (tiempo 1) cuando se aplica la prueba ANOVA F de Snedecor (Tabla 7.16), aunque únicamente la comparación de medias por LSD diferencia entre los controles sanos (T-T y T-A) y las plantas inoculadas con CL039 (Tabla 13.9.8). Pero, además, los tratamientos preventivos A(-1) y A(0) son distintos al control inoculado CL039 (Tabla 13.9.8). Por su parte, los dos tratamientos A(-1) y A(0) no son distintos a los controles sanos T-T y T-A (Tabla 13.9.8). Parece que ambos tratamientos preventivos han protegido en alguna medida.

7.3.2.1.2 Comparación de las AUDPC

Al comparar las curvas de progreso de enfermedad, mediante el cálculo de sus AUDPC estándar (AUDPCstd), para todos los momentos de aplicación del fungicida y los dos hongos inoculados se pretende conseguir, de una manera simplificada, una idea global sobre los efectos del fungicida en la enfermedad.

La variable AUDPCstd cumple las condiciones del ANOVA F. En primer lugar estudiamos las interacciones entre los dos factores considerados: hongo inoculado y momento de aplicación del fungicida, eliminando del análisis los controles sanos, que no llevan ningún hongo. Los resultados de dicho análisis (Tabla 7.18) dejan claro que las dos especies de hongos patógenos inoculadas, *P.irregulare o P.paroecandrum*, se han comportado de forma similar en este ensayo con respecto a la variable AUDPCstd. Por otro lado, no se aprecia interacción entre los dos factores del ensayo. Sin embargo, el efecto del momento de aplicación del fungicida aparece como altamente significativo (F=3,8598; p=0,0062) (Tabla 7.18).

A la vista de estos resultados, procedimos a la comparación múltiple de medias agrupando los datos en razón al factor principal "momento de aplicación del fungicida" y consideramos como control a las plantas inoculadas con ambos patógenos pero que carecían de aplicación del fitosanitario. Según el test LSD los únicos tratamientos que se distinguen significativamente del control inoculado son A(-1) y A(0) (Tablas 7.19 y 13.9.11). Por su parte A(-1) es distinto a todos excepto a A(0) (Tablas 7.19 y 13.9.11), aunque el tratamiento A(0) solo es distinto a A(2) y al control inoculado (Tablas 7.19 y 13.9.11). Por su parte Scheffé y Duncan coinciden en señalar exclusivamente la diferencia entre A(-1) y el control inoculado (Tablas 7.19 y 13.9.11).

Tabla 7.18.-Segundo ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente: AUDPCstd	
	F	p
Hongo inoculado	2,39606	0,13287
Aplicación fungicida	3,85985	0,00624*
Interacción	1,51643	0,20921

Tabla 7.19.-Segundo ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD y Duncan.

Factor: concentración de inóculo	AUDPCstd (%)
CA013	39,35±2,98 a
CL039	44,75±3,06 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	AUDPCstd (%)
Control	52,80±5,51 a
A(-1)*	26,68±2,82 c
A(0)	34,07±3,23 bc
A(1)	44,92±3,37 ab
A(2)	50,03±3,96 a
A(3)	44,01±8,50 ab
A(4)	41,86±4,39 ab

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. "*" Según Duncan y Scheffé el único tratamiento distinto del control inoculado es A(-1).

Con objeto de comparar los tratamientos con los controles sanos (T-T y T-A) los datos se sometieron a sendos análisis (para cada especie inoculada por separado), que resultaron en diferencias significativas ($p<0,05$) para ambos. El tests LSD confirma que T-T no es distinto a T-A y que ambos son distintos a todos los demás (Tabla 13.9.12). Solo para los tratamientos inoculados con CA013 se detecta ausencia de diferencia entre los controles sanos y el tratamiento A(-1) (Tabla 13.9.12).

Con todo ello se confirma nuevamente la idea de que el tratamiento preventivo con Aliette®, aplicado una semana antes de la inoculación con el patógeno (A(-1)), es el más efectivo de entre los incluidos en el ensayo.

7.3.2.2 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes de tallo y raíz principal

7.3.2.2.1 Longitud de tallo.

Las medias de todos los tratamientos se muestran gráficamente en las figuras 7.9 y 7.10.

La variable "longitud de tallo" cumplió con las condiciones previas para la correcta aplicación del test ANOVA F, por lo que se procedió al estudio de la interacción entre los efectos principales incluidos en el ensayo. El resultado del análisis concluye en la ausencia de interacción entre los factores "hongo inoculado" y "momento de aplicación del fungicida" (Tablas 7.20 y 13.9.13), establece que no hay efecto diferenciador debido al momento de aplicación del fitosanitario, pero sí detecta diferencias al considerar las plantas inoculadas con CA013 o con CL039 (Tablas 7.20 y 7.21).

En un paso más, al introducir los respectivos controles sin inocular (T-T y T-A) y evaluar los tratamientos inoculados con cada hongo por separado, tampoco se detectan diferencias significativas al nivel del 5% (F=1,25519; p=0,33130), cuando analizamos los tratamientos correspondientes al hongo CA013 (Tabla 13.9.14); por el contrario, sí aparecen diferencias significativas en las plantas tratadas con CL039 (F=3,47087; p=0,01348) (Tabla 13.9.15). La consiguiente comparación de medias solo recoge las diferencias entre el tratamiento A(2), cuyo valor medio es el menor, con todos los demás, tanto con el test LSD como con Duncan (Tabla 13.9.16). Scheffé no encuentra diferencias (Tabla 13.9.16).

Tabla 7.20.-Segundo ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	H	p	F	p
Hongo	1,08749	0,29700	12,56176	0,00151*
Aplicación fungicida	3,14639	0,79030	0,88403	0,52047
Interacción	---	---	1,68912	0,16356

Tabla 7.21.-Segundo ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre las longitudes de raíz principal y tallo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests Kruskal-Wallis (+) o F de Snedecor.

Factor: hongo inoculado	Longitud de raíz principal (cm.)+	Longitud de tallo (cm.)
CA013	7,93±0,81 a	6,98±0,31 b
CL039	8,69±0,31 a	8,04±0,14 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Longitud de raíz principal (cm.)+	Longitud de tallo (cm.)*
Control	7,13±1,12 a	7,39±0,53 a
A(-1)	9,98±1,47 a	7,05±0,34 a
A(0)	8,66±0,97 a	7,94±0,46 a
A(1)	7,75±0,87 a	7,09±0,64 a
A(2)	8,68±1,43 a	7,91±0,44 a
A(3)	7,67±0,78 a	7,59±0,66 a
A(4)	8,15±0,99 a	7,75±0,43 a

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. "*" Según Scheffé no hay diferencias significativas en ningún caso al nivel de significación del 5%. "+" La variable "longitud de raíz" se evalúa mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

7.3.2.2.2 Longitud de raíz.

Los valores medios de todos los tratamientos pueden consultarse en las figuras 7.9 y 7.10.

Los datos obtenidos en el segundo ensayo no cumplen las hipótesis previas del ANOVA F cuando se consideran los datos agrupados teniendo en cuenta los dos factores considerados en el ensayo "hongo inoculado y "momento de aplicación del fungicida" y se suprimen los controles no inoculados T-T y T-A. Su estudio mediante la prueba paramétrica de Kruskal-Wallis no encuentra diferencias significativas para ninguno de los factores considerados (Tabla 7.20 y 13.9.13).

En el estudio estadístico conjunto de todos los tratamientos, incluyendo los controles sin inocular T-T y T-A, si aparecen diferencias significativas al 5%, tanto para las plantas inoculadas con CA013 como con las inoculadas con CL039(Tabla 13.9.14 y 13.9.15). Según la comparación múltiple de medias por Duncan, lo más destacado es la ausencia de diferencias significativas entre el tratamiento A(-1)-13 y sus controles T-T y T-A y, sin embargo , sí que se distingue del control inoculado con CA013 (Tabla 13.9.17). Esto puede suponer un cierto efecto protector del tratamiento A(-1)-13 en cuanto a este carácter. LSD coincide en este hecho (Tabla 13.9.17). Para Scheffé no hay diferencias entre ninguno de los tratamientos (Tabla 13.9.17). En cuanto al estudio de los tratamientos relacionados con CL039, según LSD y Duncan al 5%, solo T-A es distinto a todos los demás tratamientos, incluso distinto a T-T, porque es el que ha desarrollado una raíz principal más larga (Tabla 13.9.17); por su parte, el tratamiento A(-1)-39 solo es distinto a los tratamientos A(2)-39, A(3)-39 y T-A (Tabla 13.9.17).

7.3.3 TERCER ENSAYO

7.3.3.1 Incidencia de enfermedad: Mortalidad

Los valores medios de mortalidad acumulada para los dos aislados ensayados y para los 6 momentos de aplicación del fungicida quedan expuestos gráficamente en las figuras 7.11 y 7.12.

7.3.3.1.1 Mortalidad para tiempo fijo

El estudio de los datos de mortalidad acumulada registrados cada semana, desde el momento de la inoculación (tiempo 0) hasta la quinta semana desde la inoculación (tiempo 5), para los dos inóculos en conjunto y considerando todos los tratamientos, mediante la aplicación del análisis de varianza F de Snedecor, detecta diferencias significativas ($p<0,05$) en todos los tiempos (Tabla 7.22).

El estudio de las posibles interacciones entre los dos factores introducidos en el ensayo, "hongo inoculado" y "momento de aplicación del fungicida", (Tabla 7.23) revela la ausencia de interacciones, por lo que podemos simplificar el análisis de los datos recurriendo a agruparlos en función de los dos factores. Según esto, solo aparecen diferencias en el comportamiento de los dos aislados para los tiempos 3 y 5, es decir, para las semanas tercera y quinta desde la inoculación (Tabla 7.23). Por su parte, los efectos del momento de aplicación del fungicida son significativos únicamente en las semanas finales del ensayo (tiempos 4 y 5) (Tabla 7.23).

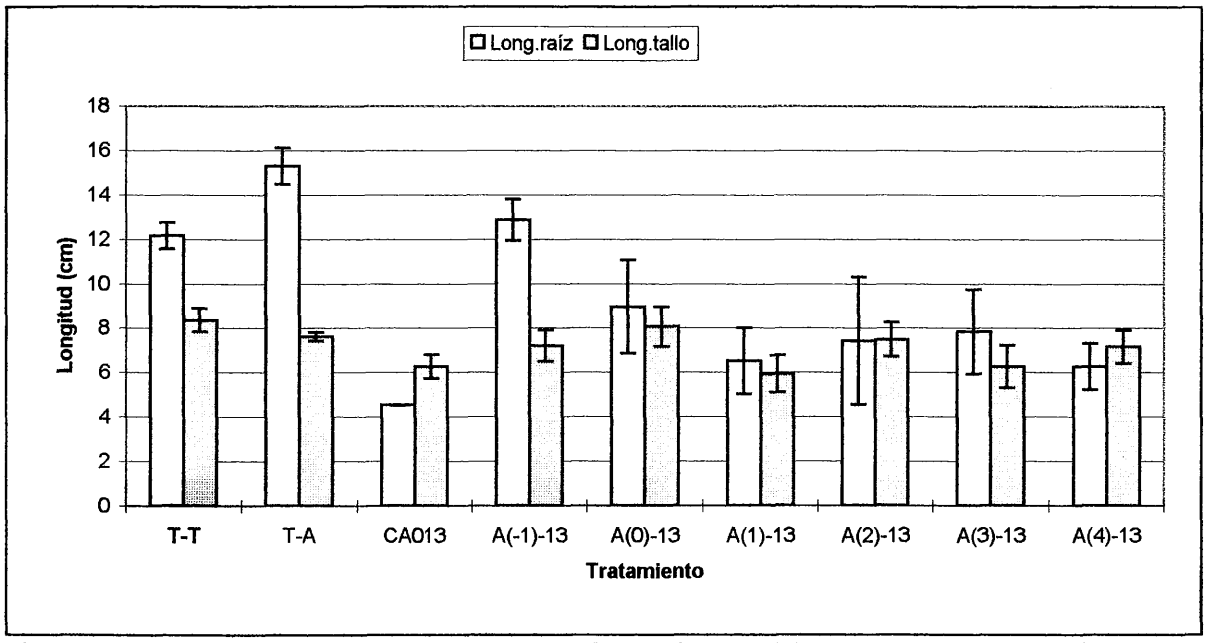


Fig.7.9-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013. Segundo ensayo.

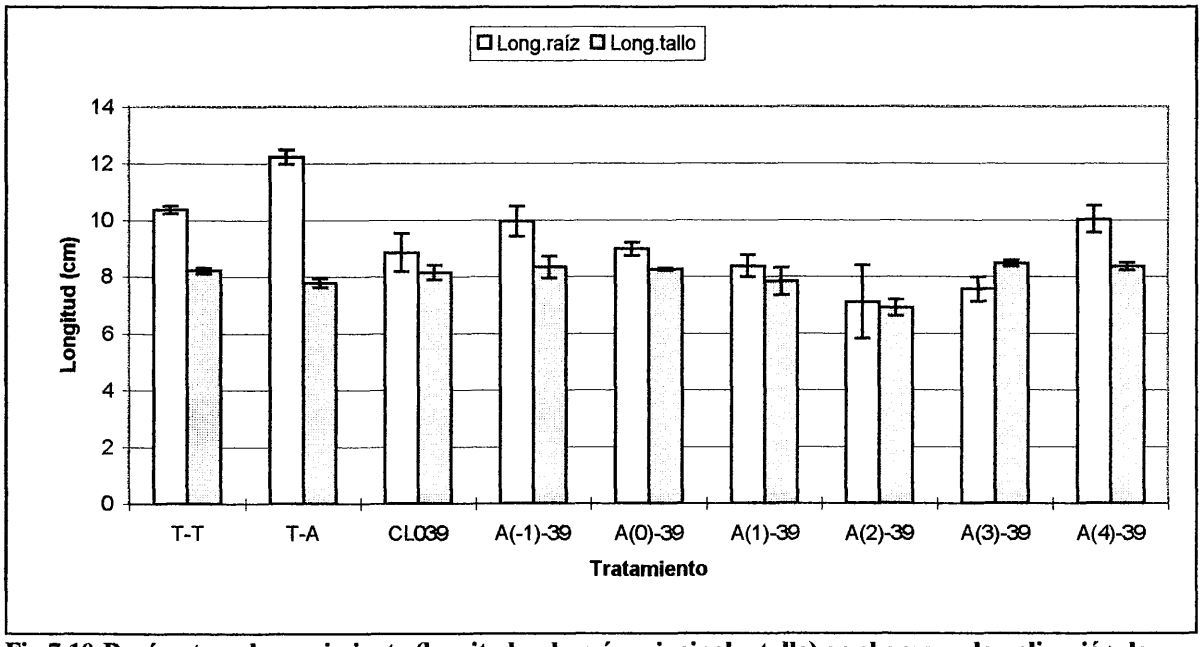


Fig.7.10-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CL039. Segundo ensayo.

Tabla 7.22.-Tercer ensayo. Valores del Análisis de varianza según la prueba F de Snedecor, aplicada a los datos de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación, con los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum*, incluyendo en el análisis los controles sin inóculo, sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Variable: mortalidad acumulada		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(15,32)	p
1	3,39849	0,00179
2	5,73005	0,00002
3	5,61411	0,00002
4	6,02917	0,00001
5	5,64256	0,00002

Tabla 7.23.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida referido al momento de la inoculación y de la interacción entre ambos factores. Valores de los estadísticos según los tests de Kruskal-Wallis o F de Snedecor, aplicados a los datos de mortalidad acumulada. Se excluyen del análisis los controles no inoculados con el hongo. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Factor: Hongo inoculado		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(1,28)	p
1	3,09097	0,08966
2	0,53973	0,46865
3	4,49556	0,04297
4	3,60673	0,06789
5	4,49832	0,04292

Factor: Momento de aplicación del fungicida		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,28)	p
1	0,44637	0,84129
2	2,17025	0,07635
3	2,35771	0,05719
4	2,63610	0,03737
5	2,89942	0,02512

Factor: Interacción		
Tiempo	ANOVA	
(sdi)	F(6,28)	p
1	1,55447	0,19743
2	1,90991	0,11423
3	1,26657	0,30421
4	2,07994	0,08779
5	2,21136	0,07166

Así pues, recurrimos, para dichos tiempos 4 y 5, a los tests de comparación múltiple de medias para el análisis de las diferencias de mortalidad sufrida por las plantas sometidas a la aplicación del fungicida en los diferentes momentos y por los controles inoculados con los hongos y no tratados con el fitosanitario.

Para la semana 4 (tiempo 4) los resultados según los tests LSD y Duncan coinciden entre sí y presentan al tratamiento A(0) como el único que se diferencia significativamente ($p<0,05$) del control inoculado y de todos los demás tratamientos con la única excepción del tratamiento A(-1) (Tabla 13.9.18). El tratamiento A(-1) en este caso no es diferente a ninguno de los demás (Tabla 13.9.18). No hay ninguna otra diferencia entre tratamientos (Tabla 13.9.18). El test de Scheffé no detecta ninguna diferencia entre las medias para el mismo nivel de significación (Tabla 13.9.18). Se obtienen exactamente las mismas conclusiones para los datos de la última semana (tiempo 5) (Tabla 13.9.18).

De acuerdo con los resultados vistos hasta ahora parece que, en este tercer ensayo, el tratamiento que ha disminuido en algo la mortalidad provocada por los patógenos ha sido la aplicación preventiva del fungicida en el mismo momento de la inoculación A(0), con un efecto mucho más marcado que el del tratamiento aplicado una semana antes de la inoculación A(-1) (Fig.7.11 y Fig.7.12).

7.3.3.1.2 Comparación de las AUDPC

La forma de abordar el estudio estadístico de los datos de este ensayo es semejante a la del segundo ensayo (consultar apartado 7.3.2.1.2).

El resultado del estudio de las interacciones entre los dos factores confirma la ausencia de interacción y la ausencia de efecto por parte del factor "hongo inoculado"; esto es, ambos aislados se han comportado de forma similar (Tablas 7.24 y 13.9.19). En este caso el análisis paramétrico no detecta efecto del factor "momento de aplicación del fungicida" aunque con una probabilidad muy cercana al límite del 5% ($p=0,0731$) (Tablas 7.24 y 13.9.19). La comparación múltiple de medias por el método LSD da el mismo resultado que Duncan, solo señalan al tratamiento A(0) como distinto de todos los demás (Tablas 7.25 y 13.9.20). Solo para Scheffé todos los tratamientos son iguales (Tablas 7.25 y 13.9.20).

Para la comparación de todos los tratamientos con los controles sanos por LSD y Duncan se obtiene de nuevo la ausencia de diferencia entre T-T y T-A, pero en este caso ambos son distintos a todos los demás con la única excepción del tratamiento A(0)-39, que es el que presentó un valor de AUDPCstd menor (Tabla 13.9.21).

En este tercer ensayo el tratamiento que se ha mostrado más eficaz en el control de la enfermedad, con relación a los otros estudiados, ha sido el A(0), es decir, la aplicación preventiva del fungicida en el mismo momento de la inoculación.

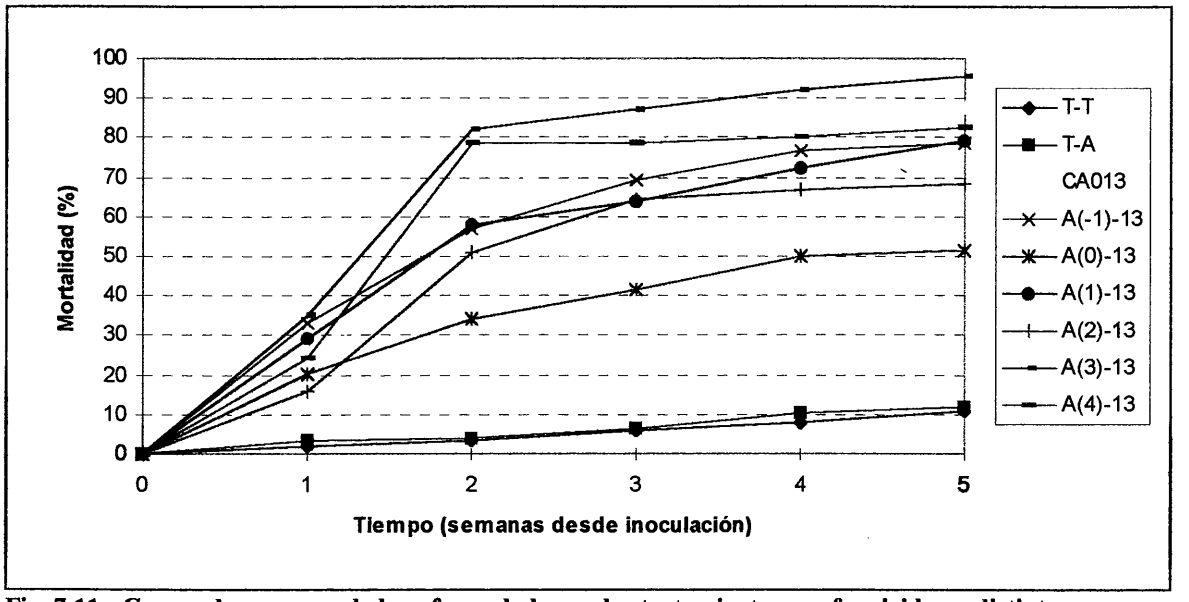


Fig. 7.11.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con el aislado CA013. Tercer ensayo.

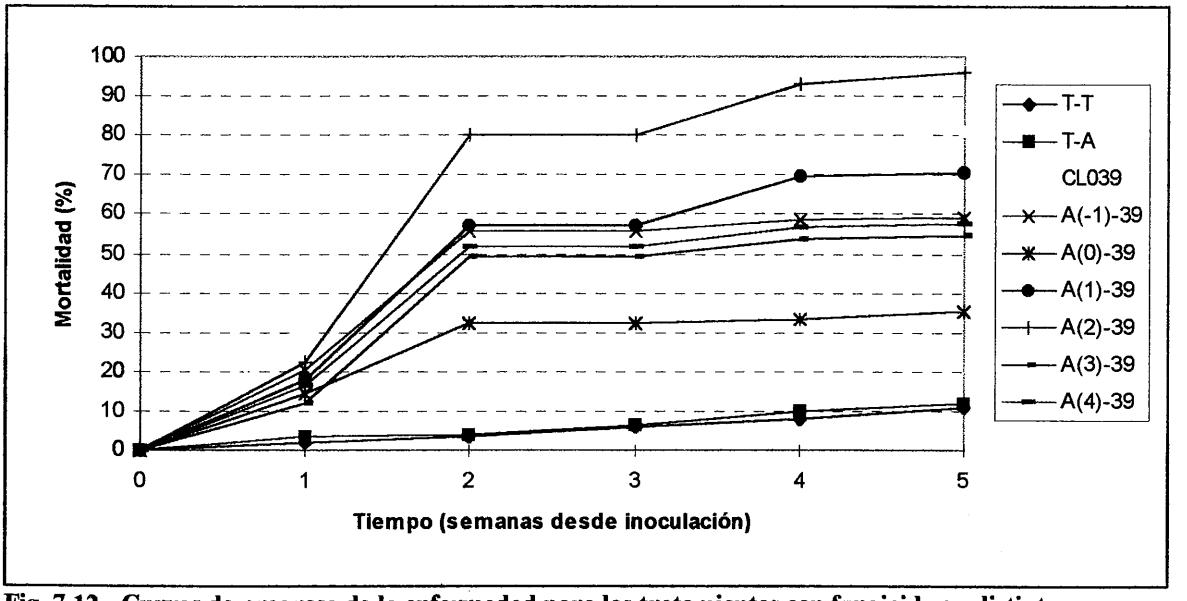


Fig. 7.12.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con el aislado CL039. Tercer ensayo.

Tabla 7.24.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente: AUDPCstd	
	F	p
Hongo	2,76892	0,10726
Aplicación fungicida	2,19779	0,07317
Interacción	1,53446	0,20355

Tabla 7.25.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra no son significativamente diferentes (p> 0,05) según los tests LSD y Duncan.

Factor: Hongo inoculado	AUDPCstd (%)
CA013	53,77±3,59 a
CL039	45,90±3,91 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	AUDPCstd (%)
Control	59,12±5,32 a
A(-1)	49,54±8,29 a
A(0)*	30,29±3,77 b
A(1)	49,90±6,93 a
A(2)	55,60±5,67 a
A(3)	53,54±8,74 a
A(4)	50,86±6,70 a

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. "*"Según Scheffé no hay diferencias entre los tratamientos.

7.3.3.2 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes y pesos frescos

7.3.3.2.1 Longitudes de raíz principal y tallo

También aquí se estudian primero las interacciones entre los factores "hongo inoculado" y "momento de aplicación del fungicida". Todas las variables cumplieron con las hipótesis de normalidad y homoscedasticidad sin necesidad de transformación.

Los valores medios de ambas variables para todos los tratamientos y los controles se muestran gráficamente en las figuras 7.13 y 7.14.

El análisis paramétrico F de Snedecor da el mismo resultado para ambas variables, no hay interacciones entre los factores y tampoco se detectan efectos significativos para los efectos (Tablas 7.26, 7.27 y 13.9.22).

Al incluir los controles sanos en el análisis tampoco se aprecian diferencias significativas al nivel del 5% en la variable "longitud de raíz principal" (Tabla 13.9.23). Contrariamente, sí se aprecian en la variable "longitud de tallo" (Tabla 13.9.23). La comparación múltiple de medias por LSD y Duncan para la variable "longitud de tallo" destaca solamente las diferencias significativas entre los controles T-T y T-A y la mayoría de los tratamientos inoculados, en concreto, los únicos tratamientos que no son distintos a ambos son las medias de A(-1)-13, A(-1)-39, A(0)-39 y A(1)-39, A(3)-39 y A(4)-39 (Tabla 13.9.24). Para Scheffé no hay diferencias entre ningún tratamiento al nivel del 5% (Tabla 13.9.24).

Tabla 7.26.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Hongo	3,44472	0,07401	3,51978	0,07110
Aplicación fungicida	0,86132	0,53499	2,18908	0,07416
Interacción	2,30109	0,06239	1,29229	0,29289

Tabla 7.27.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre las longitudes de raíz principal y tallo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: hongo inoculado	Longitud de raíz principal (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
CA013	6,95±0,22 a	4,78±0,10 a
CL039	7,57±0,28 a	5,05±0,11 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Longitud de raíz principal (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
Control	8,91±1,88 a	6,01±0,33 a
A(-1)	7,90±0,72 a	5,16±0,14 a
A(0)	7,32±0,40 a	4,98±0,23 a
A(1)	7,23±0,34 a	5,03±0,17 a
A(2)	6,91±0,63 a	4,42±0,20 a
A(3)	6,73±0,37 a	4,89±0,20 a
A(4)	7,66±0,53 a	5,21±0,21 a

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

7.3.3.2.2 Pesos frescos de sistema radicular y parte aérea.

Las figuras 7.15 y 7.16 recogen las medias de todos los tratamientos para las cuatro variables. Todas ellas cumplieron las condiciones previas del ANOVA F paramétrico sin necesidad de transformación.

Los resultados del análisis F de Snedecor para el estudio de los efectos principales y las interacciones son iguales para ambas variables: no hay interacción entre los factores, no hay efecto del momento de aplicación del fungicida y el efecto principal es el tipo de hongo inoculado (Tablas 7.28, 7.29 y 13.9.25). Parece, por tanto, que la respuesta de los dos inóculos en cuanto a los pesos frescos de parte aérea y sistema radicular ha sido distinta. Como se puede apreciar en las figuras 7.15 y 7.16 y en la Tabla 7.29 los valores medios alcanzados por las plantas inoculadas con CL039 son mayores que los de las inoculadas con CA013.

Tabla 7.28.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	21,60605	0,00007*	21,80967	0,00007*
Aplicación fungicida	1,72247	0,15259	1,64691	0,17139
Interacción	0,52683	0,78307	0,91478	0,49893

Tabla 7.29.-Tercer ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes al final del ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: hongo inoculado	Peso fresco de raíz (g)	Peso fresco de parte aérea (g)
CA013	0,0425±0,0044 b	0,0810±0,0045 b
CL039	0,0726±0,0048 a	0,1083±0,0040 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Peso fresco de raíz (g)	Peso fresco de parte aérea (g)
Control	0,0266±0,0103 a	0,0626±0,0159 a
A(-1)	0,0812±0,0179 a	0,0991±0,0081 a
A(0)	0,0559±0,0115 a	0,1103±0,0133 a
A(1)	0,0534±0,0100 a	0,0937±0,0064 a
A(2)	0,0455±0,0061 a	0,0832±0,0075 a
A(3)	0,0566±0,0094 a	0,0919±0,0133 a
A(4)*	0,0580±0,0073 a	0,1016±0,0088 a

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

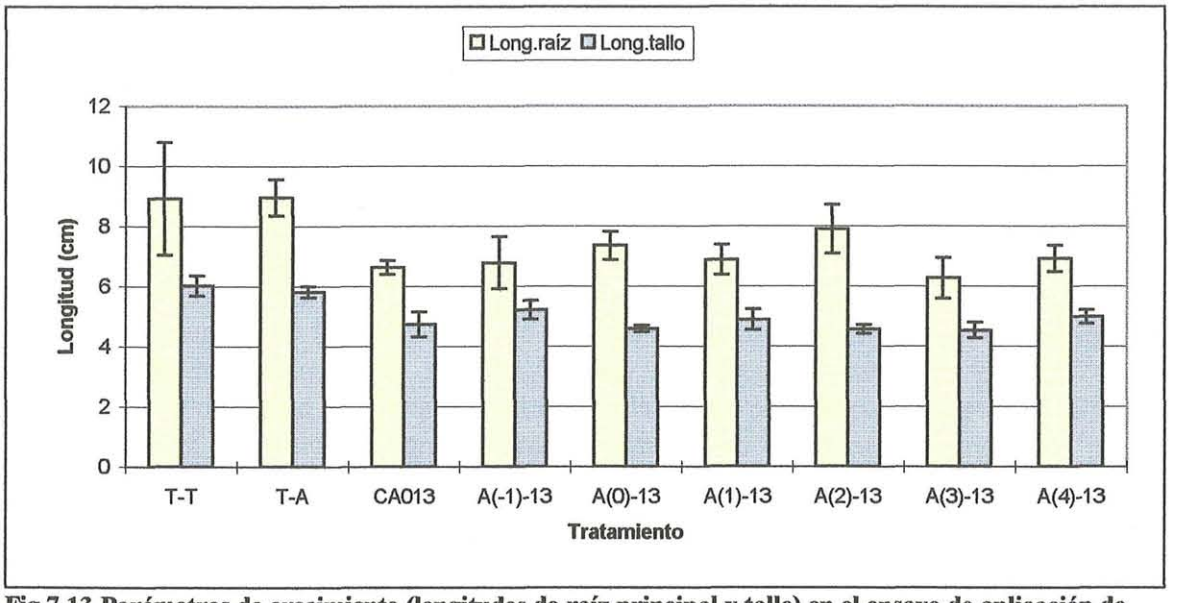


Fig.7.13-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013. Tercer ensayo.

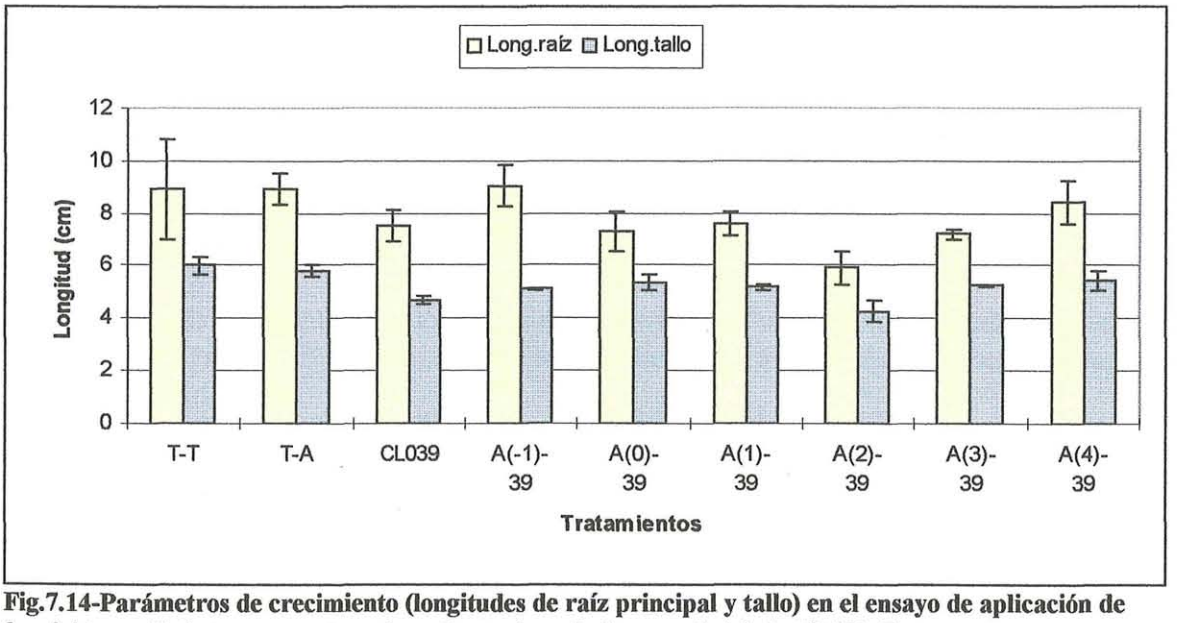


Fig.7.14-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CL039. Tercer ensayo.

El ANOVA F con inclusión de los controles sanos T-T y T-A detectan diferencias significativas (Tabla 13.9.26) para las dos variables. Para la variable "peso fresco de sistema radicular", el control T-A solo es distinto a T-T según el test LSD (Tabla 13.9.27). Por su parte T-T no se diferencia de ningún tratamiento inoculado con CA013 (Tabla 13.9.27 y Fig.7.15), pero se diferencia de prácticamente todos los tratados con CL039 (Tabla 13.9.27 y Fig.7.16). Duncan da un resultado similar, algo más restrictivo, solo son diferentes las comparaciones entre T-T y los tratamientos A(-1)-39, A(0)-39 y A(1)-39 (Tabla 13.9.27). Para Scheffé no hay diferencias entre ninguno de los tratamientos. La variable "peso fresco de parte aérea" sigue un patrón similar (Tabla 13.9.28).

En resumen, no hay ningún efecto del fungicida sobre los parámetros de crecimiento, tanto longitudes como pesos frescos. No hay interacciones entre los efectos "hongo inoculado" y "momento de aplicación del fungicida". Solo para los pesos frescos de tallo y de raíz se detecta el efecto del hongo inoculado sobre estas variables: en general las plantas inoculadas con CA013 presentan valores medios menores a los de CL039 para ambas variables.

7.3.4 CUARTO ENSAYO

7.3.4.1 Incidencia de enfermedad: Mortalidad

7.3.4.1.1 Mortalidad para tiempo fijo

En el último ensayo se recogen los datos de mortalidad acumulada cada semana comenzando en el momento de la inoculación (tiempo 0) y concluyendo en la cuarta semana desde la inoculación (tiempo 4) (Fig.7.17 y 7.18).

El análisis conjunto de todos los tratamientos y todos los controles aplicando la prueba F de Snedecor (Tabla 7.30) destaca diferencias significativas ($p<0,05$) desde la segunda semana hasta el final del ensayo.

Por su parte, el análisis de las posibles interacciones reconoce su existencia solo en los tiempos 2 y 4 (Tabla 7.31). En el tiempo 1 el efecto principal es el tipo de hongo inoculado, mientras que en los otros tres, tanto el "hongo inoculado" como el "momento de aplicación del fungicida" presentan diferencias significativas ($p<0,05$) (Tabla 7.31).

Lo más destacado de las comparaciones entre las medias mediante el test LSD para el tiempo 2 con el aislado CA013 es que el tratamiento A(0) es el único que no se diferencia significativamente de los controles T-T y T-A y sí se diferencia de todos los demás (Tabla 13.9.29). Por su parte, el control inoculado CA013 es también distinto a los tratamientos A(-1), A(0) y A(2) (Tabla 13.9.29). Estos mismos resultados se obtienen con el test de Duncan (Tabla 13.9.29). Para Scheffé, solo A(-1), A(0) y A(2) son iguales a los controles T-T y T-A (Tabla 13.9.29) y A(0) es distinto del control CA013 y de A(1) (Tabla 13.9.29).

Para el mismo tiempo 2 y el test LSD las plantas inoculadas con CL039, los tratamientos A(-1), A(0) y A(1) son iguales entre sí e iguales a los controles T-T y T-A (Tabla 13.9.29). Los únicos tratamientos distintos al control inoculado CL039 son A(-1) y A(0) (Tabla 13.9.29). El test de Duncan confirma los resultados anteriores (Tabla 13.9.29). Para Scheffé no hay diferencias significativas en ningún caso (Tabla 13.9.29).

Tabla 7.30.-Cuarto ensayo. Valores del Análisis de varianza según la prueba F de Snedecor, aplicada a los datos de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con los dos aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum*, incluyendo en el análisis los controles sin inóculo, sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Variable: mortalidad acumulada		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(15,20)**	**p**
1	2,13827	0,05663
2	13,91348	0,00000
3	21,88123	0,00000
4	27,32904	0,00000

Tabla 7.31.-Cuarto ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida referido al momento de la inoculación y de la interacción entre ambos factores. Valores del estadístico según el test F de Snedecor, aplicado a los datos de mortalidad acumulada. Se excluyen del análisis los controles no inoculados con el hongo. Los valores subrayados indican diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Factor: Hongo inoculado		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(1,14)**	**p**
1	8,29899	0,01209
2	67,42804	0,00000
3	68,98304	0,00000
4	63,44980	0,00000

Factor: Momento de aplicación del fungicida		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(6,14)**	**p**
1	1,09248	0,41340
2	11,92041	0,00000
3	16,01735	0,00000
4	19,93692	0,00000

Factor: Interacción		
Tiempo	**ANOVA**	
(sdi)	**F(6,14)**	**p**
1	0,92094	0,50886
2	3,47249	0,02575
3	2,84958	0,04989
4	3,65337	0,02145

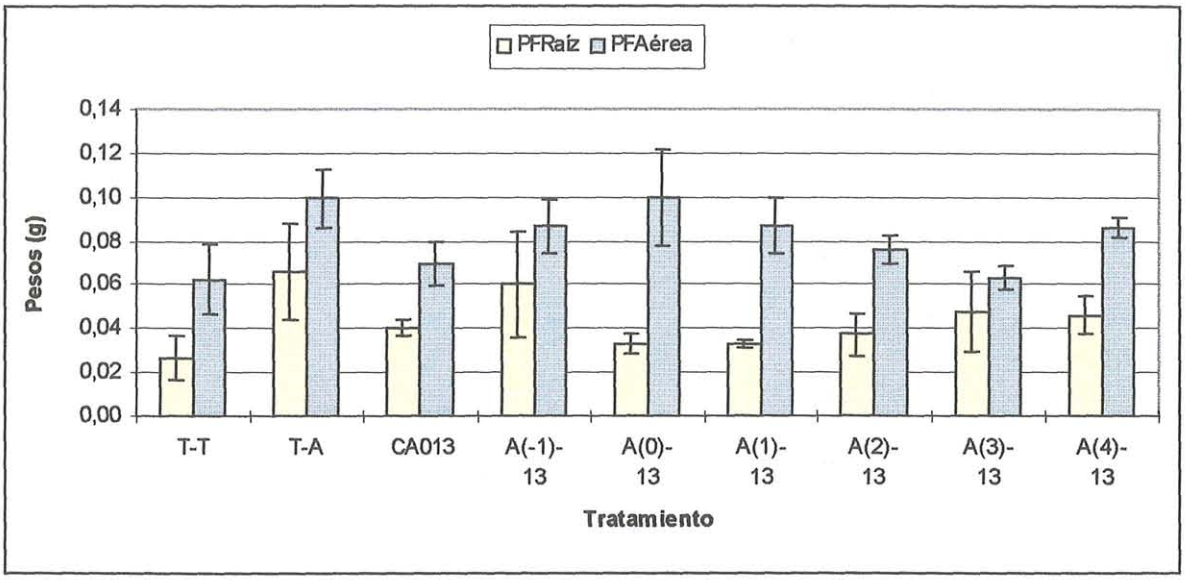


Fig.7.15-Parámetros de crecimiento (pesos frescos) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013. Tercer ensayo.

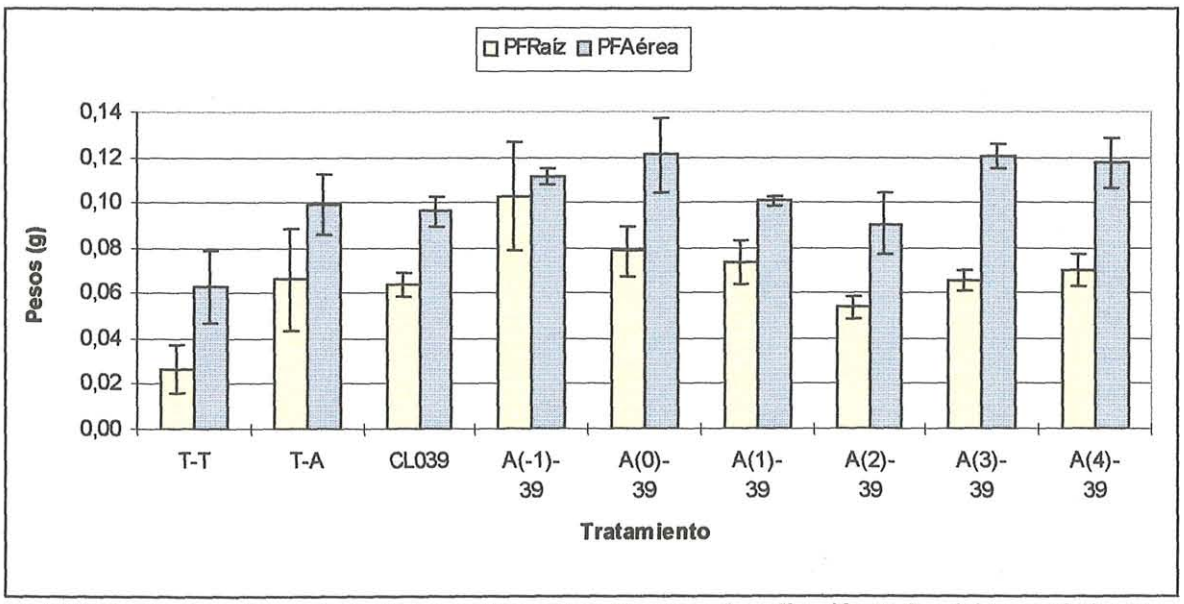


Fig.7.16-Parámetros de crecimiento (pesos frescos) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CL039. Tercer ensayo.

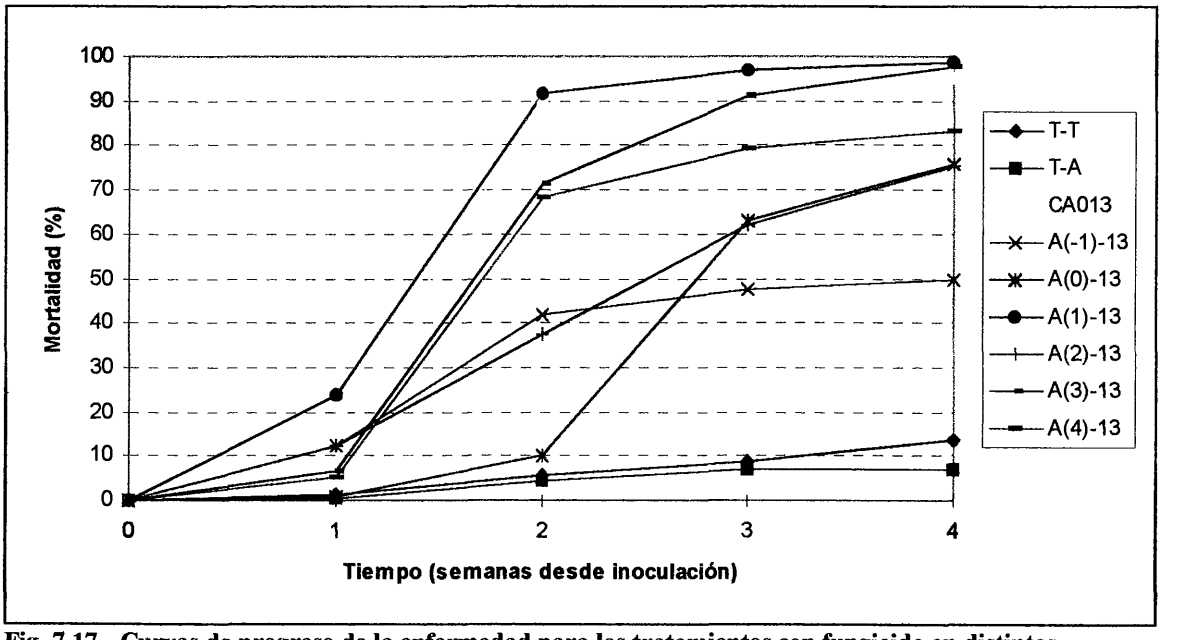


Fig. 7.17.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con el aislado CA013. Cuarto ensayo.

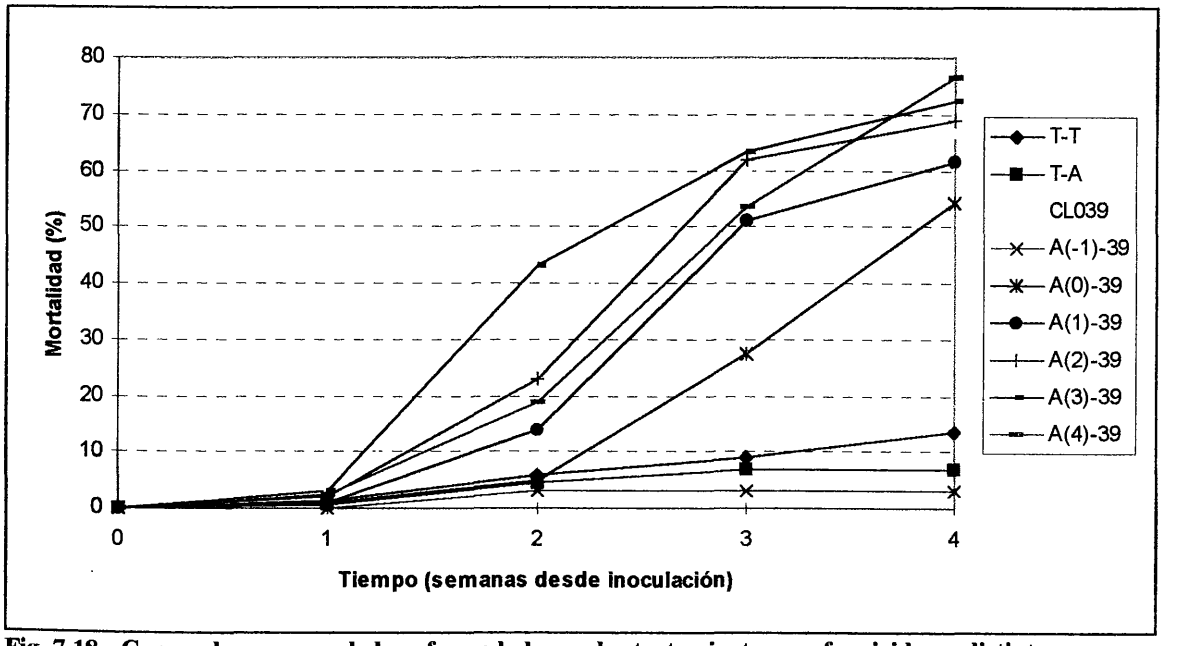


Fig. 7.18.- Curvas de progreso de la enfermedad para los tratamientos con fungicida en distintos momentos de aplicación. Plantas inoculadas con el aislado CL039. Cuarto ensayo.

En el tiempo 3 las diferencias de comportamiento en relación al momento de aplicación del fungicida se analizan en conjunto para ambos aislados, dada la ausencia de interacciones ya vista (Tabla 7.31). Según los tres tests de comparación de medias los tratamientos distintos al control inoculado son A(-1) y A(0) (Tabla 13.9.29). El tratamiento A(2) también se distingue del control pero solamente si consideramos el test LSD (Tabla 13.9.29). El tratamiento A(-1) es distinto de todos los demás, excepto la igualdad que detecta Scheffé en su comparación con A(0) (Tabla 13.9.29). El tratamiento A(0) es igual a A(2) aunque con una significación muy cercana al límite del 5% (Tabla 13.9.29).

La comparación de tratamientos en la última semana del ensayo para cada aislado por separado confirma, para CA013, las diferencias entre el control CA013 y los tratamientos A(-1), A(0) y A(2), tanto con el test LSD como con el de Duncan (Tabla 13.9.29). Estos tres tratamientos se comportan de forma similar, sobre todo al comparar A(0) con A(2) (Tabla 13.9.29 y Fig.7.17). Para Scheffé ningún tratamiento inoculado se diferencia del control inoculado (Tabla 13.9.29).

Por último, en el tiempo 4 y considerando los tests LSD y de Duncan, las plantas inoculadas con CL039 y tratadas con el fungicida una semana antes de la inoculación A(-1)-39, contrariamente a lo ocurrido para las inoculadas con CA013, se asemejan en su comportamiento a los controles sanos T-T y T-A (Tabla 13.9.29). A(-1)-39 es, por lo demás, distinto a todos los demás (Tabla 13.9.29). En este caso, A(0) es distinto de los controles sanos y no lo es del control inoculado CL039 (Tabla 13.9.29). El tratamiento A(2) se comporta de forma similar a su control inoculado CL039 (Tabla 13.9.29). Para Scheffé se dan diferencias claras entre A(-1) y el resto de tratamientos con excepción de A(0) (Tabla 13.9.29).

7.3.4.1.2 Comparación de las AUDPC

Siguiendo las pautas fijadas en los ensayos anteriores (consultar 7.3.3.1.2 y 7.3.2.1.2) estudiamos las interacciones entre los dos factores: hongo inoculado y momento de aplicación del fungicida. El análisis paramétrico con exclusión de los controles sanos (T-T y T-A) da como significativos tanto los factores como la interacción entre ellos (Tablas 7.32 y 13.9.30), y procede estudiar el conjunto de los tratamientos. Según esto, a diferencia de lo que ocurría en los ensayos anteriores, las dos especies tienen comportamientos distintos frente al otro factor (Tabla 13.9.31).

Según los tests de comparación múltiple de medias aplicados al conjunto de todos los tratamientos, para ambos hongos inoculados, lo más destacado es el hecho de que se confirma la igualdad entre T-T y T-A, la diferencia de ambos con respecto a la mayoría del resto de los tratamientos y la relativa efectividad de los tratamientos A(-1) y A(0), principalmente del tratamiento A(-1) inoculado con CL039, como ahora veremos (Tabla 7.33).

Tabla 7.32.-Cuarto ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente: AUDPCstd	
	F	p
Hongo	86,89591	0,00000*
Aplicación fungicida	16,63737	0,00001*
Interacción	3,66745	0,02114*

LSD detecta diferencias significativas entre los controles sanos y todos los demás tratamientos con excepción de A(-1)-39, que es el tratamiento que ha sufrido la menor mortalidad acumulada, incluso de valor inferior a los controles sanos (Tabla 7.33 y 13.9.33). Este tratamiento se comporta de distinta forma dependiendo del hongo que le ha sido inoculado: mientras que A(-1)-13 es igual a A(0)-13, por el contrario A(-1)-39 es distinto a A(0)-39 (Tablas 7.33, 13.9.32 y 13.9.33). Por su parte, A(0)-39 solo es igual a A(1)-39 (Tablas 7.33 y 13.9.33).

Tabla 7.33.-Cuarto ensayo. Comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd), calculada a partir de los valores de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con los aislados CA013 de *P.irregulare* y CL039 de *P.paroecandrum* sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (p> 0,05) según LSD, según Duncan (letras entre paréntesis "()") y Scheffé (letras entre corchetes "{}").

	AUDPCstd (%)	
Tratamiento	P.irregulare (CA013)	P.paroecandrum (CL039)
T-T	5,74±1,59 d (d) {b}	5,74±1,59 c (cd) {ab}
T-A	3,95±2,15 d (d) {b}	3,95±2,15 c (d) {b}
Control	61,86±4,12 a (a) {a}	32,45± 0,53 a (a) {a}
A(-1)	31,61± 13,99 c (c) {ab}	1,88± 0,52 c (d) {b}
A(0).	27,97± 3,94 c (c) {ab}	15,16± 4,48 b (bc) {ab}
A(1)	65,28± 1,13 a (a) {a}	24,26± 1,02 ab (ab) {ab}
A(2)	37,44± 3,06 bc (b) {a}	30,34± 2,10 a (ab) {ab}
A(3)	54,49± 5,06 ab (ab) {a}	36,43± 2,98 a (a) {a}

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero con aplicación de fungicida; Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Lo más notorio de Scheffé es que T-T y T-A siguen sin presentar diferencias entre ellos, y que tanto A(-1)-13 como A(0)-13 o A(-1)-39 y A(0)-39 no se diferencian de ningún tratamiento, tanto controles sanos como inoculados, tratados o no con el fungicida (Tablas 7.33, 13.9.32 y 13.9.33).

El test de Duncan también recoge la igualdad entre T-T y T-A, ambos son distintos a todos los tratamientos excepto a A(-1)-39 (Tablas 7.33, 13.9.32 y 13.9.33). Ambos controles inoculados son significativamente distintos a sus respectivos tratamientos A(-1) y A(0) (Tablas 7.33, 13.9.32 y 13.9.33). A(-1)-39 es distinto a todos los tratamientos inoculados, incluido A(0)-39, mientras que A(-1)-13 es distinto a todos excepto a A(0)-13 (Tablas 7.30, 13.9.32 y 13.9.33).

En resumen, para las plantas inoculadas con el aislado CL039 los resultados concuerdan con los de ensayos precedentes (excepto el tercer ensayo), siendo el tratamiento preventivo A(-1) el que parece aportar una protección eficaz (la mortalidad acumulada se mantiene en niveles inferiores a los controles sanos). El tratamiento A(0) tiene un efecto menos marcado (Fig.7.18). Por su parte, las plantas inoculadas con el aislado CA013 han reaccionado de forma menos evidente aunque siguiendo la misma tendencia. Tanto A(-1) como A(0) parecen comportarse de la misma manera y se diferencian tanto de los controles sanos como de los inoculados, solo pudiendo asimilarse al tratamiento A(2), que ha sufrido una mortalidad menor a la de otros tratamientos (Fig.7.17), de manera que sigue notándose un ligero efecto protector de estos tratamientos aun no siendo tan claro.

7.3.4.2 Efectos sobre los parámetros de crecimiento: longitudes y pesos frescos

7.3.4.2.1 Longitudes de raíz principal y tallo

También en este ensayo los datos de longitud cumplen las condiciones previas para ser estudiados mediante la prueba F de Snedecor sin necesidad de transformarlos. Las medias se expresan gráficamente en las figuras 7.19 y 7.20.

El estudio de los efectos principales y de su interacción confirma exactamente los resultados obtenidos en el ensayo precedente: no hay interacciones entre los factores "hongo inoculado" y "momento de aplicación del fungicida" y ninguno de ellos produce efecto alguno (Tablas 7.34, 7.35 y 13.9.34).

Por su parte, la evaluación incluyendo los controles sanos T-T y T-A por el ANOVA F, tampoco detecta diferencias significativas para ninguna de las dos variables (Tabla 13.9.35).

Tabla 7.34.- Cuarto ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza.

Factor	Variable dependiente			
	Longitud de raíz		Longitud de tallo	
	F	p	F	p
Hongo	0,03970	0,84493	2,17014	0,16283
Aplicación fungicida	1,81550	0,16773	0,25175	0,95047
Interacción	0,47330	0,81709	0,98715	0,47008

Tabla 7.35.-Cuarto ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre las longitudes de raíz principal y tallo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: hongo inoculado	Longitud de raíz principal (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
CA013	5,70±0,85 a	4,45±0,30 a
CL039	5,52±0,39 a	5,00±0,15 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Longitud de raíz principal (cm.)	Longitud de tallo (cm.)
Control	6,91±1,02 a	5,92±0,36 a
A(-1)	8,44±0,77 a	5,15±0,27 a
A(0)	6,52±1,13 a	4,93±0,46 a
A(1)	4,80±0,95 a	4,36±0,60 a
A(2)	5,93±2,08 a	4,64±0,91 a
A(3)	5,33±0,76 a	4,71±0,43 a

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

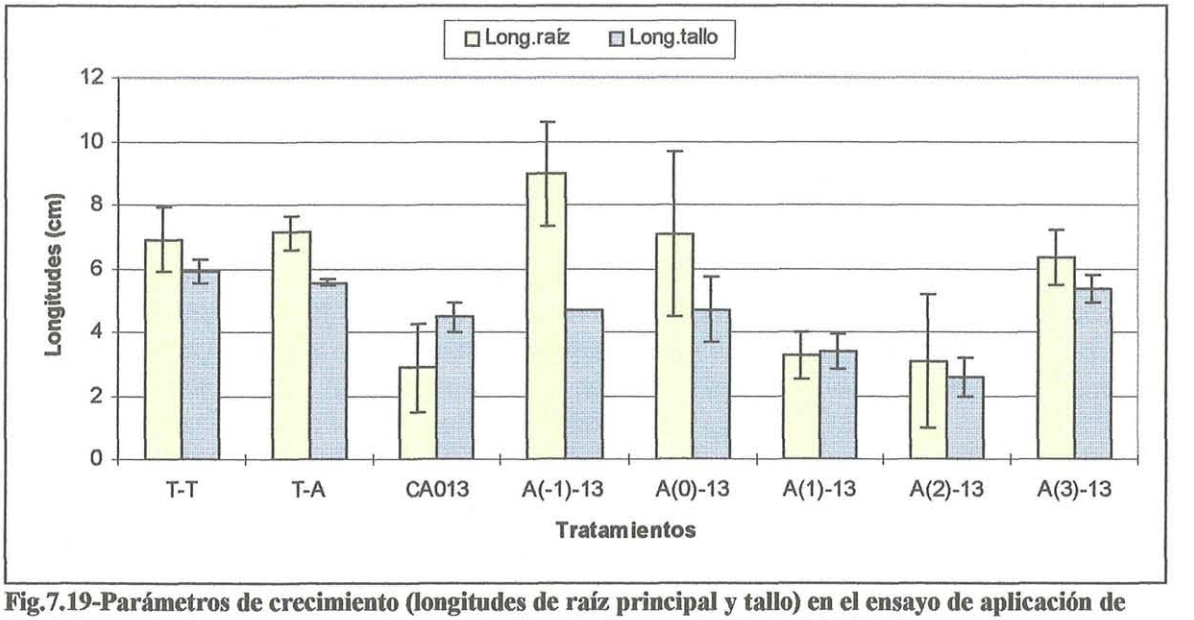


Fig.7.19-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013. Cuarto ensayo.

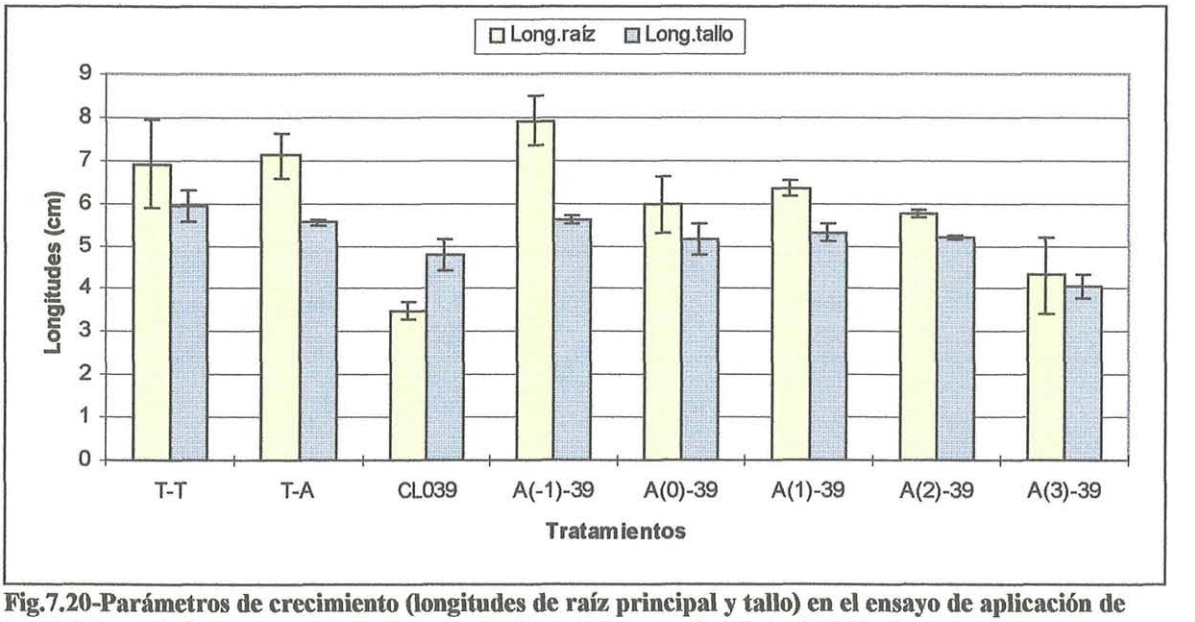


Fig.7.20-Parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CL039. Cuarto ensayo.

7.3.4.2.2 Pesos frescos de sistema radicular y parte aérea.

Las figuras 7.21 y 7.22 resumen gráficamente los valores medios de las variables "peso fresco de sistema radicular" y "peso fresco de parte aérea" obtenidos en este último ensayo.

Coincidiendo con lo obtenido en el ensayo anterior, aquí tampoco se detecta interacción entre los factores "hongo inoculado" y "momento de inoculación", y tampoco hay efectos aparentes (al nivel de significación del 5%) de ninguno de los factores; con una salvedad, la del efecto "hongo inoculado", pero esto es exclusivamente en lo referente a la variable "peso fresco de sistema radicular" (Tablas 7.36, 7.37 y 13.9.36).

El análisis estadístico con la inclusión de los controles sin inóculo por medio del ANOVA F, detecta diferencias significativas únicamente para la variable "peso fresco del sistema radicular" transformada (Tabla 13.9.37). Tanto el test LSD como el de Duncan coinciden en señalar al tratamiento A(3)-13 como el único diferente a todos los demás (Tablas 13.9.38 y 13.9.39 y Figs.7.21 y 7.22). Según Scheffé no hay ninguna diferencia (Tablas 13.9.38 y 13.9.39).

Tabla 7.36.- Cuarto ensayo. Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de sistema radicular y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza. Los valores marcados con asterisco "*" resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Factor	Variable dependiente			
	Peso fresco raíz		Peso fresco parte aérea	
	F	p	F	p
Hongo	12,36176	0,00342*	0,07128	0,79337
Aplicación fungicida	1,49906	0,24879	0,64650	0,69255
Interacción	2,71473	0,05797	1,19085	0,36601

Tabla 7.37.- Cuarto ensayo. Efecto del hongo inoculado y del momento de aplicación del fungicida sobre los pesos frescos de sistema radicular y parte aérea de las plantas supervivientes al final del ensayo. Los valores (media ± error típico) seguidos por una misma letra para cada variable no son significativamente diferentes (p> 0,05) según la prueba F de Snedecor.

Factor: hongo inoculado	Peso fresco de raíz (g)	Peso fresco de parte aérea (g)
CA013	0,0369±0,0065 a	0,0549±0,0075 a
CL039	0,0171±0,0022 b	0,0527±0,0029 a

Factor: Momento de aplicación del fungicida	Peso fresco de raíz (g)	Peso fresco de parte aérea (g)
Control	0,0216±0,0080 a	0,0693±0,0075 a
A(-1)	0,0263±0,0043 a	0,0634±0,0029 a
A(0)	0,0276±0,0074 a	0,0562±0,0065 a
A(1)	0,0199±0,0036 a	0,0454±0,0094 a
A(2)	0,0340±0,0141 a	0,0629±0,0215 a
A(3)	0,0427±0,0207 a	0,0536±0,0124 a

Control= plantas inoculadas con CA013 o con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

En síntesis podemos decir que no hay interacciones ni efectos para las longitudes de raíz y tallo, ni siquiera al comparar con los testigos sanos. Tampoco hay diferencias notables en cuanto a los pesos frescos.

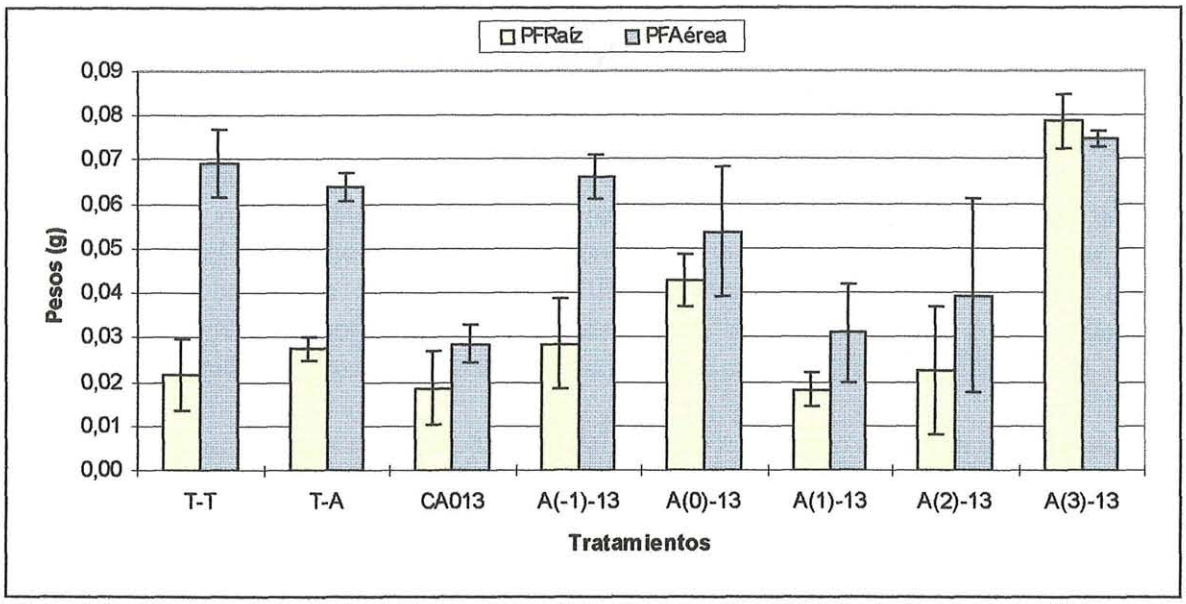


Fig.7.21-Parámetros de crecimiento (pesos frescos) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CA013. Cuarto ensayo.

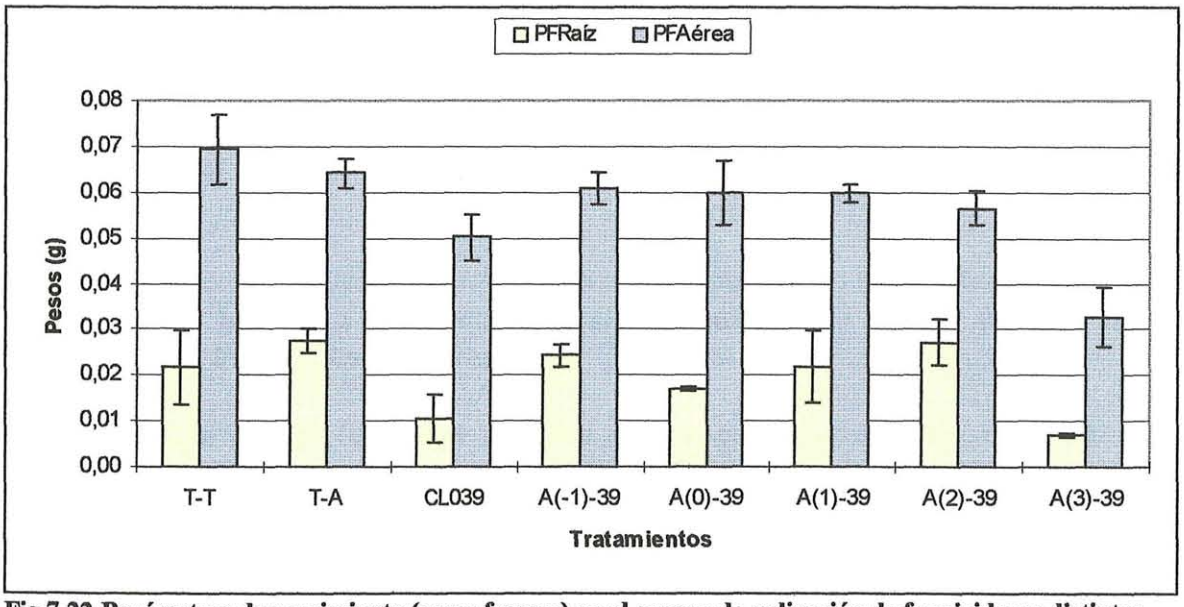


Fig.7.22-Parámetros de crecimiento (pesos frescos) en el ensayo de aplicación de fungicida en distintos momentos sobre plantas inoculadas con el aislado CL039. Cuarto ensayo.

7.4 DISCUSIÓN

Un primer hecho que se concluye de los ensayos realizados, aunque no ha sido comprobado estadísticamente, sería que, para la dosis de fungicida empleada, el patógeno se recupera de todas las plantas inoculadas, tratadas o no con el fungicida, y tanto de las muertas como de las supervivientes, por lo que puede deducirse que el fungicida no evita la penetración del patógeno ni la colonización de las raíces del huésped. Entramos así en contradicción con otros trabajos como el de KANNWISCHER Y MITCHELL (1978) que no pudieron recuperar el hongo de las raíces de plantas de tabaco tratadas con metalaxil. No hemos encontrado ninguna cita sobre trabajos similares en los que se utilice fosetil-Al.

Las conclusiones extraídas a partir del análisis estadístico de los datos de mortalidad acumulada recogidos semanalmente y de su transformación en curvas de progreso de enfermedad pueden resumirse en los aspectos que veremos a continuación.

En primer lugar, el tratamiento con el fungicida no ha protegido completamente en ninguna de las aplicaciones; los tratamientos son con frecuencia distintos a los testigos sin inóculo. El fenómeno no es nuevo, los fungicidas aplicados después de que hayan aparecido los síntomas de la enfermedad en raíz pueden no ser efectivos (JAMES,1985).

ENGELHARD (1992), por su parte, realizó un estudio comparativo de eficacia entre los fungicidas fosetil-Al y etridiazol utilizando plantas ornamentales de los géneros *Petunia*, *Dianthus*, *Verbena* y *Poinsettia* afectadas por podredumbre de raíz producida por *Pythium*, y concluyó que fosetil-Al ofrecía un control de la enfermedad muy escaso. Además, parámetros de crecimiento de las plantas (altura, peso de parte aérea y desarrollo de sistema radicular) rendían valores menores en las plantas tratadas con fosetil-Al que en las tratadas con etridiazol.

En general, la aplicación del fungicida sobre planta sana no ha supuesto ningún cambio detectable en relación a las plantas normales, es más, puede incluso que favorezca su crecimiento en longitud, en algunos casos.

Se sabe que los fungicidas aplicados al suelo pueden retardar el crecimiento de las plántulas. Por ello se recomienda la aplicación inmediatamente después de la siembra. Pero debido a estos problemas se recomienda el uso del control químico solamente cuando todas las demás medidas de control hayan fallado (JAMES,1985). En nuestro caso no solo no retarda el crecimiento sino que parece que lo estimula en cierta manera.

A pesar de estar considerado el fosetil-Al como un fungicida muy eficaz contra *Phytophthora* en coníferas, hay registrados casos de la experiencia de los viveristas en Francia, en donde se cita la actividad mediocre e incluso la ineficacia del producto utilizado a la dosis recomendada por el fabricante (VEGH Y COL.,1994). E incluso ensayos de eficacia realizados en condiciones de campo por los mismos autores que concluyen que el fosetil-Al (Aliette®) sufrió una disminución notable en su eficacia frente a *Phytophthora cinnamomi* Rands aplicado a arbustos y coníferas ornamentales en contenedor, por lo que recomiendan que se alterne su uso con otros fungicidas y que se incrementen las medidas profilácticas.

Otros autores también han observado fallos en el control al utilizar Aliette® (ENGELHARD,1992).

Otro ejemplo puede ser la falta de control por parte del fungicida en plantas de tabaco susceptibles a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* a partir de los 50 días después de su aplicación. Este hecho puede deberse a una reducción en la eficacia del fungicida con el tiempo, a cambios en la fisiología de la planta o al crecimiento de las raíces fuera de la zona de suelo protegida con el fungicida, con la consiguiente infección (KANNWISCHER Y MITCHELL,1978).

Contrariamente a nosotros, DE WAARD Y VAN ROOIJEN (1978) consiguieron controlar la podredumbre de raíz y cuello producida en estaquillas de *Saintpaulia* en macetas durante al menos 6 semanas con una sola aplicación de fosetil-Al, en condiciones de elevada infección y temperaturas entre 18 y 20°C. Los patógenos inoculados fueron *Phytophthora nicotianae* y *Pythium spinosum*.

Otros autores (JAMART Y COL.,1983) estudiaron la eficacia de seis fungicidas activos contra "damping-off" producido por *Pythium* en plantas ornamentales (*Tagetes, Viola, Impatients, Zinnia, Godetia, Bellis*) y estudiaron también su posible fitotoxicidad. Entre los fungicidas ensayados figuraban metalaxil, fosetil-Al, etridiazol y propamocarb, todos ellos aplicados al suelo. En estos ensayos, el fungicida fosetil-Al dio buen control de la enfermedad, pero por detrás de metalaxil y propamocarb. Al duplicar la dosis del fungicida (pasando de 0,8 g/m^2 a 1,6 g/m^2) aumentaba su eficacia (disminuyendo la incidencia de damping-off). Todos los tratamientos fungicidas disminuyeron significativamente la incidencia de la enfermedad con respecto al control sano. En cuanto a la fitotoxicidad, solo el metalaxil a elevada concentración (1 g/m^2) provocó efectos de fitotoxicidad, disminuyendo el peso fresco de parte aérea de plantas de *Tagetes* en semillero a las 5 semanas de la siembra.

En el año 1985 se detectó el primer caso de resistencia a fosetil-Al. Se trataba de un cultivo de *Chamaecyparis lawsoniana* en vivero afectado por *Phytophthora cinnamomi* (BLOOMBERG,1985). Según nuestra experiencia en la Comunidad de Madrid, fosetil-Al tampoco controló la enfermedad en las condiciones de los ensayos, pero no tenemos datos para afirmar que esto se deba a que nuestros aislados de *Pythium* fueran resistentes al fungicida.

En todos los ensayos realizados los momentos de aplicación del fungicida más convenientes son los **preventivos**, esto es, la aplicación una semana antes de la inoculación A(-1) o en el mismo momento de la inoculación A(0). Para la mayoría de los ensayos, el mejor momento para la aplicación del fungicida parece ser una semana antes de la introducción del patógeno, aunque esta aplicación no supone un control total de la enfermedad, ni siquiera un control eficaz en muchas ocasiones. En este punto hay que tener en cuenta las condiciones particulares de los ensayos realizados (una sola aplicación del producto, semillero sometido a elevada densidad de plantación, condiciones ambientales que favorecen al patógeno y que someten a las plantas a un crecimiento rápido (tejidos menos lignificados que en condiciones de cultivo al aire libre) e inoculación de aislados altamente virulentos en dosis de inóculo elevadas). Solo en el tercer ensayo la aplicación del fitosanitario en el mismo momento de la inoculación (tratamiento A(0)) ha resultado ser más efectivo que el A(-1), aunque, ocasionalmente, en los otros ensayos también ha mostrado un comportamiento mejor que el resto de los tratamientos.

En el primer ensayo se obtienen los mismos resultados con ambas concentraciones de inóculo. Parece que nos movemos en unas concentraciones de inóculo en las que el hongo se comporta de la misma forma. Por su parte, refiriéndonos al resto de los ensayos en los que se comparaba el efecto del hongo inoculado, encontramos que, en los ensayos segundo y tercero, la especie de hongo inoculada no ha tenido influencia sobre el efecto principal que ha sido el momento de aplicación del fungicida. Tampoco ha habido interacciones entre ambos factores. Por el contrario, en el último ensayo (ensayo cuarto) los resultados obtenidos con cada aislado han sido significativamente diferentes, aunque se pueden extraer conclusiones muy similares a los ensayos anteriores en cuanto a los tratamientos preventivos A(-1) y A(0).

Algunos investigadores recomiendan aplicación preventiva de Aliette®, aunque han comprobado que el producto tiene la capacidad de paralizar el desarrollo miceliar en las 48 horas posteriores a la contaminación en los frutos cítricos en campo (SOLER Y COL.,1997).

En cuanto a la **persistencia del posible efecto protector** la tendencia que se apunta en los momentos finales de los ensayos es la posibilidad de que exista una cierta protección por parte del tratamiento más precoz (A(-1)) y que dicho efecto persista en el tiempo porque confiera a las plantas una ventaja en las primeras fases de la enfermedad; es decir, que si en las primeras semanas de la enfermedad Aliette® disminuye la mortalidad de las plantas, aunque sea ligeramente, esto se convierte en una ventaja que se mantendrá en las siguientes semanas, posiblemente porque permita a las plántulas crecer y fortalecerse (lignificarse por ejemplo) y así hacerse más tolerantes al ataque del patógeno.

LAZAROVITS (1985) realizó unos ensayos de aplicación del fungicida pyroxifur[1] contra *Phytophthora megasperma,* patógeno de la soja, y observó que solo con las concentraciones más elevadas del fungicida conseguía efectos protectores completos incluso para las concentraciones de inóculo mayores. El efecto protector era más evidente durante los primeros 21 días desde la siembra[2], sin embargo el beneficio inicial conseguido durante estas primeras semanas se mantenía tiempo después, de forma similar a lo que nos ocurrió a nosotros. Además, el fungicida tuvo cierto efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, favoreciéndolo ligeramente. Las conclusiones de LAZAROVITS fueron que el fungicida ofreció una protección efectiva solo durante un espacio breve de tiempo y que una vez disipados sus efectos el desarrollo de la enfermedad dependía de la concentración del inóculo y del mecanismo de resistencia de las plantas. Los efectos de la enfermedad se notaban entonces en el peso y altura de las plantas supervivientes. El fungicida incrementó en un 20% el crecimiento de las plantas respecto al control inoculado con *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, tanto si se considera la altura como el peso de las plantas supervivientes. En el caso de la soja los parámeros de crecimiento constituyen un excelente indicador de la sensibilidad del cultivar al patógeno. Por otro lado, de sus resultados concluye el autor que si la enfermedad evoluciona muy rápidamente (ya sea por una elevada densidad de inóculo, una cepa muy virulenta, un huésped poco tolerante o condiciones de cultivo muy favorables al patógeno) los efectos beneficiosos del fungicida desaparecerán rápidamente. Aunque nosotros no hemos encontrado diferencias significativas al comparar dos concentraciones de inóculo, no podemos excluir la posibilidad de que el fungicida sea capaz de proteger de forma más

[1] Activo contra *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora capsici* y, moderadamente, contra *Pythium aphanidermatum*, y no activo contra hongos no ficomicetos. No está comercializado en España.
[2] La aplicación del fungicida consistía en el recubrimiento de la semilla antes de la siembra.

destacada y persistente para unos niveles de inóculo mucho menores o para unos aislados menos agresivos.

No obstante, las diferencias entre tratamientos no son siempre inequívocas, posiblemente debido a la elevada variabilidad de comportamiento de las plantas dentro de las repeticiones en un mismo tratamiento (dado el carácter de heterogeneidad genética de la semilla utilizada), aspecto que será tratado específicamente en el apartado 8.DISCUSIÓN GENERAL. Esta misma variabilidad dentro de los grupos puede justificar la ausencia de diferencias significativas en cuanto a los efectos de los tratamiento fungicidas sobre los parámetros de crecimiento.

Resumiendo, nuestro resultado es que la efectividad del producto es escasa cuando los niveles de inóculo en suelo son medios o elevados y la planta es muy joven, aunque no hemos ensayado niveles de inóculo bajos. También de nuestro trabajo deducimos que las aplicaciones tempranas (tratamientos preventivos) son las más eficaces, principalmente las realizadas una semana antes de la inoculación o, en ocasiones, en el mismo momento de la inoculación. No hemos estudiado aplicaciones reiteradas.

Basándonos en estos hechos debemos recomendar que la aplicación de tratamientos fungicidas a base de Aliette® se realice en los semilleros con carácter preventivo, antes de que aparezcan los primeros síntomas de enfermedad. Y para tratar de evitar al máximo el uso excesivo de productos fitosanitarios recomendamos extremo cuidado en el manejo de las plantas y los sustratos, limpieza de las instalaciones y utensilios y control riguroso de las condiciones ambientales, principalmente temperatura y humedad, tanto ambiental como en el sustrato.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Dada la variedad de temas tratados en este trabajo, la discusión de los resultados de cada una de las secciones se ha realizado por separado al final de cada capítulo. No obstante, existen puntos en común entre todos ellos que merecen un tratamiento conjunto y que hemos considerado apropiado relacionar en este apartado general.

8.1 PATOGENICIDAD, VIRULENCIA Y MORTALIDAD

Las características morfológicas de los aislados de *Pythium* varían con las variaciones en temperatura, luz y nutrientes (HENDRIX Y CAMPBELL,1973). Hay también elevados niveles de variabilidad intraespecífica entre aislados de una misma especie que se detectan cuando se comparan bandas de proteínas en geles de electroforesis. De igual forma, la mayoría de las diferencias entre especies e individuos, tienen un carácter fisiológico y se refieren al parasitismo o patogenicidad. Hay evidencias de que diferentes cepas de un mismo patógeno (*P.ultimum*, por ejemplo) presentan distintos niveles de virulencia (CHAGNON Y BELANGER,1991). Por tanto, las conclusiones de los ensayos basados en la patogenicidad solo son extrapolables al aislado utilizado en los ensayos y no necesariamente indica la habilidad de la especie o del género en su conjunto (HENDRIX Y CAMPBELL,1973). En nuestros ensayos hemos empleado los aislados más virulentos con objeto de estudiar al patógeno en las condiciones más favorables para él. Sin embargo, el hecho de que prácticamente en todos los casos no hayamos detectado diferencias de comportamiento entre las tres especies nos permite una cierta generalización de los resultados.

En relación a esto es importante resaltar que en nuestro trabajo los aislados de las tres especies de *Pythium* más utilizados han presentado el mismo comportamiento en todos los aspectos estudiados (mortalidad, efectos sobre el crecimiento, control químico, etc.); por tanto, a nivel práctico, para el tratamiento y control de las enfermedades producidas por *Pythium* en los cultivos ornamentales en vivero, lo imprescindible parece ser la determinación del agente patógeno hasta el nivel de género, aún más si se tiene en cuenta la diferente sensibilidad ante los productos fitosanitarios químicos.

El tipo de inóculo que se utilice en los ensayos (oosporas, micelio, zoosporas, etc.) no influye en la patogenicidad mostrada por los aislados de diversas especies de *Pythium*, se producen los mismos síntomas (MOULIN Y COL.,1994). En *P.irregulare* la infección se puede iniciar a partir de la germinación de oosporas, zoosporas y esporangios (AGNIHOTRI Y VAARTAJA,1970). La inoculación con fragmentos de hifas también causa infección pero a menor velocidad (VAN DER PLAATS-NITERINK,1981). En nuestros ensayos hemos usado preferentemente suspensiones de oosporas (o "cuerpos reproductores" en el caso de *P. intermedium*) con algunos restos de micelio. No hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de la enfermedad con relación al tipo de inóculo empleado.

No existen referencias en los textos científicos a la mortalidad producida por especies de *Pythium* sobre *C.arizonica,* ni siquiera sobre otras especies del género. Según GRIFFIN (1965), citado por PHILLIPS Y BURDEKIN (1982), las pérdidas debidas a *Pythium* en coníferas (en concreto, sus estudios se refieren a *Picea* sp.) en Gran Bretaña, pueden alcanzar el 50% de las plantas, aunque normalmente son del orden del 5% o menores. La patogenicidad de

P.irregulare también ha sido comprobada en plantas de *Pinus halepensis* y *Pinus pinea* por FREZZI (1956).

En ensayos realizados "in vitro" en medio sintético, VAARTAJA (1975) valoró el "potencial patogénico" de algunos aislados de *Pythium sylvaticum* sobre *Pinus resinosa* Ait. Sus propios resultados y los de HENDRIX Y CAMPBELL (1968) le llevaron a resaltar el papel que desempeña la micoflora competidora del suelo, de modo que aislados altamente virulentos en el medio sintético pueden ser solo ligeramente virulentos en suelo no estéril. HENDRIX Y CAMPBELL (1968) habían encontrado que la misma especie era débilmente virulenta en plantas de pino en suelo y con concentraciones de inóculo bajas (<20 cfu/g.ss).

Varios autores coinciden en que el porcentaje de plantas muertas por *Pythium* spp. puede oscilar entre 0 y 100 según el aislado utilizado (MOULIN Y COL.,1994; MOULIN Y COL.,1996), con un valor medio alrededor del 10% para los viveros de árboles forestales (PERRIN Y SAMPANGI,1986). Por ejemplo, *P.irregulare* mataba al 17% de las plantas y *P.intermedium* mataba al 75% de las plantas de pepino a los 6 días de la inoculación (MOULIN Y COL.,1994). Estudios realizados sobre tolerancia en geranio a *P.ultimum* obtienen una mortalidad media del 20%, dependiendo del cultivar, durante las primeras tres semanas desde la inoculación (CHAGNON Y BELANGER,1991). En nuestros ensayos en condiciones controladas, todos los aislados provocaron una elevada mortalidad en las primeras semanas.

Tanto *P.irregulare* como *P.intermedium* se citan como especies altamente virulentas sobre varios huéspedes (HENDRIX Y CAMPBELL,1973; VAN DER PLAATS-NITERINK,1981) lo que coincide con lo obtenido por nosotros.

Las referencias bibliográficas encontradas, aunque relativas a otros huéspedes, cifran el período de incubación de la enfermedad producida por especies patógenas de *Pythium* en el plazo de una semana desde la inoculación aproximadamente. Por ejemplo, en cultivo de tomate los efectos de la enfermedad (mortalidad y marchitez) comienzan a evidenciarse a los 6 días de la inoculación y se incrementan durante las siguientes 2 semanas. A partir de entonces se estabilizan (MOULIN Y COL.,1996). Por su parte, FREZZI (1956) consiguió reproducir la enfermedad en plántulas de avena y trigo, aunque falló en cebada. A los 8 días de la inoculación las plantas detuvieron su crecimiento y comenzaron a amarillear. Además se produjo necrosis de todo el sistema radicular.

MOULIN Y COL. (1994) en sus ensayos con pepino en cultivo hidropónico inoculados con *Pythium* spp. notaron que la máxima mortalidad producida por el patógeno se advertía a los 6 días desde la inoculación y que a partir de ese momento no cambiaba.

Nuestros resultados coinciden con los de estos investigadores, en general durante los primeros 7-14 días comienzan a morir las plantas de *Cupressus arizonica* a mayor velocidad, para tender a estabilizarse a medida que avanza el tiempo desde la inoculación.

8.2 GERMINACIÓN DE CUPRESSUS

Los cipreses, en los viveros de producción de la Comunidad de Madrid, se multiplican normalmente por semilla y esa fue la razón por la que en nuestros ensayos escogimos este material de propagación. CATALÁN (1991) sitúa el porcentaje de germinación de las semillas de *Cupressus arizonica* var. *glabra* en torno al 20-30%. Sin embargo, nosotros no hemos alcanzado tales cifras, ni siquiera después de aplicar los procedimientos que el mismo autor sugiere, tales como remojo durante 24-48 horas antes de la siembra o estratificación a 4°C durante 30-60 días. Por esto, tuvimos que utilizar grandes cantidades de semilla, de modo que pudiéramos asegurar la nascencia de la cantidad mínima de plántulas que necesitábamos en cada ensayo.

No fue este el único problema con el que nos encontramos a la hora de plantear los ensayos. Además, la emergencia, que se producía a las dos o tres semanas de la siembra, era irregular y estaba poco sincronizada, con lo que nos encontrábamos que, aún partiendo de las mismas condiciones, del mismo lote y de la misma cantidad de semilla, el número de plantas nacidas en cada bloque era ampliamente dispar. Esto nos comprometía a sembrar un exceso de semilla y a eliminar las plantitas sobrantes a medida que iban apareciendo y, además, nos obligó a desistir en nuestra pretensión inicial de estudiar también el "damping-off" en pre-emergencia que, por otro lado, es extremadamente difícil de apreciar ya que las infecciones, cuando se producen en la semilla, originan la necrosis de los tejidos y su desintegración bajo la superficie del suelo (AGRIOS,1988).

Algunos investigadores afirman que el nivel de enfermedad causado por una especie de *Pythium* es similar en pre- y en post-emergencia (ABAD Y COL.,1994). PAWUK (1979), por el contrario, no encontró "damping-off" de pre-emergencia en sus ensayos con *Pythium ultimum* Trow sobre pinos en semillero, pero si lo observó en post-emergencia, con una mortalidad media del 86,3% a las 12 semanas de la siembra. Ya hemos explicado que no pudimos evaluar la enfermedad en pre-emergencia pero, a la vista de los resultados de los ensayos de influencia de edad del huésped, sospechamos que nuestros aislados son capaces de producirla.

8.3 IRREGULARIDAD DE RESULTADOS

Durante todo el trabajo ha sido una constante la elevada variabilidad que hemos encontrado dentro de los grupos. Probablemente sea debido a que trabajamos con poblaciones de *Cupressus arizonica* procedentes de semilla cuya variabilidad genética se hace patente con solo observar las diferencias morfológicas (forma, tamaño y color de la copa) en cualquier grupo de plantas nacidas de semillas procedentes de la misma planta-madre.

La gran cantidad de factores que influyen en la enfermedad, entre ellos el genotipo del huésped y las condiciones ambientales, y su variabilidad que escapa a nuestro control, es la causa de la irregularidad de los resultados que hace difícil su interpretación. No obstante, aunque estadísticamente no se puedan considerar "certezas" si podemos estimar "tendencias" que, cuanto menos, alimentan nuestro conocimiento y acrecientan nuestra experiencia sobre el comportamiento **real** de la enfermedad.

Como apuntaban MOULIN Y COL. (1994), es un concepto ampliamente aceptado que la fisiología de la planta puede influir en gran medida en el comportamiento de los *Pythium*. Esto pudiera explicar la inconsistencia de los resultados en algunos experimentos, tales como los efectos sobre las longitudes de raíz o tallo, o la efectividad del tratamiento fungicida, los distintos valores de mortalidad acumulada, variaciones en el período de incubación, etc.

Los huéspedes, dependiendo de las condiciones ambientales (pH, conductividad, temperatura, humedad, etc.) a las que estén sometidos y de su composición genética, son más o menos susceptibles a la enfermedad. Un ejemplo lo ofrecen distintos cultivares de geranio que mostraron diferentes niveles de tolerancia frente al ataque de *P. ultimum*, detectables en mortalidad, reducción en el crecimiento y retrasos en floración (CHAGNON Y BELANGER,1991).

WONG Y COL. (1984) estudiaron los efectos de la temperatura y la humedad del suelo sobre la patogenicidad de algunos hongos productores de podredumbres de raíz en trébol subterráneo en Australia, entre ellos *P.irregulare*. Encontraron que la incidencia más grave se daba a temperaturas frescas (10 °C) y humedad en suelo elevada (65% de la capacidad de campo). *P.irregulare* era menos virulento a temperaturas superiores (con un mínimo a 20°C).

Los autores (WONG Y COL.,1984) explican esto con la posibilidad de que las temperaturas más bajas sean menos favorables para el huésped que las más elevadas, y sugieren que el patógeno podría aprovechar esta debilidad de la planta sometida a temperaturas adversas. En nuestro caso parece ocurrir este mismo fenómeno pero con las temperaturas elevadas (*C.arizonica* se encuentra fuera del óptimo a temperaturas superiores a los 26- 28°C, con lo que el patógeno puede actuar con mayor facilidad).

En los ensayos en condiciones controladas hemos tratado de controlar los factores de temperatura, fotoperíodo y en cierta forma la humedad y de mantenerlos dentro de unos límites comunes para todos los tratamientos susceptibles de ser comparados, pero desconocemos el efecto de posibles variaciones en otros factores que no podemos cuantificar.

En los ensayos de campo el efecto de las condiciones atmosféricas es aún más determinante e imposible de controlar.

KANNWISCHER Y MITCHELL (1978), estudiando la enfermedad provocada por *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* observaron diferencias entre los resultados obtenidos en condiciones controladas y en invernadero, en cuanto a progresión de la enfermedad en función de la densidad de inóculo. Nuestra experiencia coincide con este planteamiento. La gravedad de la enfermedad en los ensayos al aire libre ha sido mucho menor a la registrada en condiciones controladas. Las condiciones ambientales en la naturaleza son tan variables e imprevisibles, tan difícilmente controlables y tan determinantes que, con frecuencia, invalidan nuestra tendencia a extrapolar los resultados obtenidos en condiciones controladas.

8.4 EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO

En todos los ensayos hemos evaluado el efecto de los patógenos sobre el crecimiento de las plantas supervivientes a la inoculación, con resultados variables pero, en general, coincidentes con la mayoría de lo publicado al respecto.

Se sabe que *Pythium* es capaz de producir muerte de plántulas, reducir el crecimiento y limitar la producción o rendimientos de un cultivo (CHAGNON Y BELANGER,1991; MOULIN Y COL.,1994).

El "damping-off" y la podredumbre de raíz consiguiente pueden reducir el tamaño y número de las plantas en el semillero o en el vivero (PHILLIPS Y BURDEKIN,1982). No es extraño encontrar casos en los que la reducción en el crecimiento se produce en ausencia de cualquier otro síntoma de enfermedad, lo que hemos citado en el epígrafe 1.INTRODUCCIÓN GENERAL como infección "subclínica" (FAVRIN Y COL.,1988). Por ejemplo, los sistemas radiculares de plantas de lechuga inoculadas con *P.dissotocum*, aparentemente sanos, presentaron sin embargo una reducción significativa en el peso fresco de raíz a 18 °C, aunque no a 28°C (STANGHELLINI Y KRONLAND,1986). Similares resultados obtuvieron HODGES Y COLEMAN (1985) en *Agrostis palustris*, donde la reducción se produjo tanto en peso de raíz como de tallo.

Hay muchos más trabajos en los que se refieren los efectos del patógeno sobre el crecimiento del huésped. Citaremos algunos de ellos.

Ensayos realizados por PAWUK (1979) inoculando semilleros de pinos con *Pythium ultimum*, en donde recogió datos de pesos secos de las plántulas a las 12 semanas de la siembra (momento de la inoculación también puesto que sembró las semillas en el sustrato inoculado), muestran que las plantas inoculadas presentan unos valores de peso menores que los de las plantas sin inocular.

Otras plantas ornamentales (*Juniperus conferta*) inoculadas con *P.irregulare*, y otros patógenos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora*, registraron una disminución significativa tanto del peso fresco de la planta entera (raíz y parte aérea) como de un índice de tamaño (que el propio autor calculó como la media aritmética entre la altura y la anchura de la planta)

frente a los controles sanos (GILL,1977). GILL encontró un crecimiento radicular muy pobre que, sorprendentemente, no afectaba al crecimiento de la parte aérea en las inoculaciones con la mayoría de los patógenos (*P.nicotianae* y *P.sylvaticum*), a excepción de *P.irregulare* y *Phytophthora cinnamomi*. Por ello, sugiere que algunas enfermedades de raíz pueden a menudo estar presentes en plantas cultivadas en contenedor sin que sean detectadas por el aspecto de la parte aérea de las plantas y, es más, que algunos pobres resultados en el transplante pueden estar causados por esas enfermedades de raíz.

SOUTHERN Y COL. (1976) en ensayos con soja encontraron que *P.irregulare* produjo una marcada reducción en la altura de las plantas inoculadas para densidades de inóculo de 500 y 1.000 oosporas/g.suelo, y también en el peso seco de raíz para 250 y 500 oosporas/g.suelo. *P.irregulare* redujo significativamente el desarrollo del sistema radicular de plantas de *Pinus* spp. (HENDRIX Y CAMPBELL,1968).

Los efectos del patógeno sobre el crecimiento lógicamente también dependen de las condiciones ambientales, entre las que la temperatura destaca por ser el factor más y mejor estudiado. *P.irregulare* provocó daños en raíces secundarias y reducción en altura de plantas de algodón a temperaturas de 23/13°C (día/noche). Asimismo provocó necrosis radicular y retrasos en el crecimiento de tallo a temperatura constante de 15 y 19 °C, pero a temperaturas mayores no (RONCADORI Y MCCARTER,1971). Sin embargo, los autores señalan que, si los daños en raíz son muy severos, pueden observarse daños en plantas incluso durante la estación más desfavorable para el patógeno (el verano caluroso). Según sus trabajos, la temperatura óptima para la producción de podredumbres en raíz de algodón por parte de *P.irregulare* es de 15 °C, es más, a esta temperatura tanto la raíz como el tallo se vieron significativamente reducidos. A 19 °C solo la longitud del tallo se vio afectada, aunque las raíces mostraban síntomas evidentes de lesiones y zonas oscurecidas. A temperaturas más elevadas (23 a 31 °C) ni el crecimiento de la planta se vio afectado, ni se produjeron severas podredumbres de raíz. También el peso de raíz se redujo por efecto del hongo significativamente.

En plantas de pepino en cultivo hidropónico los aislados más virulentos de *Pythium* indujeron una reducción significativa en el crecimiento de raíces y tallos en comparación con los controles sanos. Los aislados más débilmente patógenos no presentaron estas diferencias ni síntomas en raíz (MOULIN Y COL.,1994). En geranios cultivados en invernadero e inoculados con *P.ultimum*, a las 8 semanas de la inoculación, las plantas inoculadas pero supervivientes mostraron una reducción significativa en peso seco tanto de parte aérea como de sistema radicular en comparación con el control sano. La reducción fue ligeramente mayor para el parámetro de comparación de los sistemas radiculares (CHAGNON Y BELANGER,1991).

Parece existir una correlación negativa entre el peso de la planta e incidencia de la enfermedad. El peso del tallo también se ve reducido por los patógenos (WONG Y COL.,1984).

Sin embargo, el grado de podredumbre de raíz no siempre está relacionado con reducciones en el crecimiento de la parte aérea (longitud de tallo o altura de plantas) debido a las considerables diferencias entre el crecimiento de las plantas individuales dentro de un mismo tratamiento (debido a la variabilidad genética indicada con anterioridad). Esto mismo les ocurrió a RONCADORI Y MCCARTER (1971) con plantas de algodón.

De igual modo, bajo condiciones controladas, se ha comprobado que la reducción en el peso fresco de raíz no supone necesariamente una reducción en el peso fresco de la parte aérea (HENDRIX Y CAMPBELL,1968). Los autores apuntan la posibilidad de que en esas condiciones ideales para la planta la ausencia de estrés y de competencia con otras plantas permite al huésped vencer al patógeno. Por el contrario, en las condiciones de cultivo normales en campo, el patógeno tendría ventaja.

8.5 DAÑOS EN RAÍZ

Además de los efectos sobre el desarrollo en longitud o peso del sistema radicular, otros pueden ser los síntomas apreciables por acción del patógeno. Patógenos de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* pueden afectar al desarrollo de la raíz modificando su crecimiento o alterando su patrón de ramificación (LARKIN Y COL.,1995). Además los cambios en la morfología de la raíz pueden reducir el crecimiento global de la planta y su vigor y sensibilizar a la planta frente a otras agresiones.

La arquitectura de la raíz puede afectar a la exploración y explotación de los recursos nutritivos del suelo, a la eficiencia del sistema de transporte de nutrientes y a los requerimientos energéticos de la raíz del sistema radicular (LARKIN Y COL.,1995). La morfología de la raíz depende del genotipo de la planta pero también puede variar con condiciones edáficas, tales como temperatura, estructura, aireación, contenido hídrico, nivel de nutrientes y pH. Y también los microorganismos del suelo son capaces de influir en ella (LARKIN Y COL.,1995). Los organismos no-simbióticos pueden influir mediante la producción de antibióticos y hormonas.

Ya citamos anteriormente los trabajos de LARKIN Y COL. (1995) llevados a cabo en plántulas de alfalfa con varias especies de *Pythium*, entre ellas *P.irregulare*. Encontraron que *P.irregulare* provocó reducciones en el crecimiento de la raíz y alteraciones en su arquitectura (estructura). En concreto, las raíces de las plantas inoculadas eran de menor tamaño y longitud y menor complejidad estructural, con un menor nivel de ramificación y una estructura monopódica o en forma de espina de pescado. Se cree que este tipo de estructura es más eficiente para la absorción de nitrógeno y agua del suelo, y tiene unos requerimientos energéticos mayores para su producción y mantenimiento. Es una estructura apropiada para suelos con baja humedad y baja fertilidad. Por el contrario, la disposición dicotómica es propia de plantas que crecen en suelos con amplias disponibilidades de agua y nutrientes, es más eficiente en el transporte de nutrientes, pero menos en la absorción. Los autores interpretan sus resultados como que el efecto del patógeno es mantener el sistema radicular en una fase juvenil o inmadura. Y lanzan las hipótesis de que los cambios en la raíz pueden concebirse como un efecto directo de la infección o como el resultado de la adaptación de la planta a la supresión o reducción en la capacidad de absorber agua y nutrientes causadas por la enfermedad.

Aislados de *P.irregulare* producen "damping-off" de pre- y post-emergencia pero la capacidad de producir esta enfermedad no está directamente relacionada con la capacidad para producir cambios en la morfología de la raíz (LARKIN Y COL.,1995). Estos autores encontraron

que *P.irregulare* causó menos "damping-off" en alfalfa que otras especies de *Pythium* pero redujo muy drásticamente el crecimiento de la raíz. Estos efectos han sido estudiados en plántulas de alfalfa de 4 semanas de edad, pero se desconoce si dichas alteraciones causadas por *Pythium* continúan en fases posteriores del desarrollo del huésped (LARKIN Y COL.,1995). En algunos casos, nosotros hemos observado un incremento en la producción de raíces secundarias laterales por encima del punto de infección.

La depresión y marchitez en las plantas pueden estar causadas, bien por un retraso en el crecimiento y desarrollo de los sistemas radiculares infectados, o bien, por la pérdida de los segmentos de raíz infectados, necrosados y muertos (LARKIN Y COL.,1995).

Los cambios en la estructura de la raíz son más sutiles y más difícilmente detectables que el crecimiento en longitud, por lo que se tiende a registrar éste último parámetro (LARKIN Y COL.,1995).

Según nuestra propia experiencia es bastante común la aparición de zonas oscurecidas y necrosadas en las raíces de *Cupressus arizonica* inoculadas con *Pythium*, acompañadas incluso de raíces estranguladas. Sin embargo, las raíces de *Petunia*, portadoras de inóculo, se mantuvieron sin daño, sanas y blancas.

9. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se ha abordado el estudio de las alteraciones en las fases de nascencia y enraizamiento de algunas plantas ornamentales de la Comunidad de Madrid, estudio que ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1.-Durante el período de estudio considerado (de finales de 1991 a principios de 1995), los patógenos que mayor incidencia han mostrado como productores de enfermedad en las plantas ornamentales cultivadas en la Comunidad de Madrid han sido los hongos del género *Pythium*. Las tres especies aisladas con mayor frecuencia han sido: *P.irregulare* Buisman (32%), *P.paroecandrum* Dreschler (21%) y *P.intermedium* de Bary (13%). Son especies polífagas que afectan a muchos huéspedes distintos.

2.-Los aislados de las tres especies producen elevada mortalidad en plántulas en semillero de *Cupressus arizonica* Greene en post-emergencia.

3.-No hay diferencias de comportamiento entre los aislados estudiados de las tres especies citadas, por lo que , a efectos prácticos no es imprescindible determinar la especie a la hora de diagnosticar el agente patógeno productor de la enfermedad.

4.-El contacto del patógeno con el huésped durante las primeras semanas desde la emergencia de las semillas, en condiciones controladas, produce unos niveles de mortalidad menores en consonancia con la edad del huésped, aunque este efecto tiende a disiparse a partir de la sexta semana desde la inoculación. Por esta razón, es recomendable mantener el efecto residual del tratamiento con objeto de proteger todo ese período.

5.-Los efectos de la enfermedad en condiciones reales de campo (umbráculo) revisten menor gravedad que los provocados en condiciones ambientales controladas.

6.-Los aislados de *Pythium* inoculados afectaron al huésped *C.arizonica* Greene principalmente en las primeras semanas desde la emergencia y aunque, en plantas de más edad, el patógeno es capaz de penetrar en su sistema radicular, su capacidad de producir enfermedad disminuye drásticamente a medida que el huésped se desarrolla.

7.-El transplante no ha favorecido la incidencia de la enfermedad en las plantas de *Cupressus*, por lo que parece probable que las plantas que presentaban daños en vivero en los meses posteriores al transplante, y de las que obtuvimos nuestros aislados de *Pythium*, hubieran sido infectadas por el patógeno en las fases anteriores a éste; es decir, durante su cultivo en semillero. El semillero es el período más crítico del cultivo y, por consiguiente, el que se debe proteger con mayor empeño.

8.-La edad de la planta en el momento en que entra en contacto con el patógeno es un factor principal que afecta a la incidencia de la enfermedad producida por *Pythium* en plantas de *C.arizonica* Greene en sermillero y primer año de cultivo, y conlleva ciertas irregularidades en el desarrollo posterior de las plantas supervivientes y asintomáticas.

9.-Aunque *Pythium* es capaz de colonizar el sistema radicular de plantas de *Petunia* en semillero, no es capaz de producir la muerte del huésped, ni síntomas aparentes de enfermedad. Puede ejercer algún efecto perjudicial en el crecimiento de la planta que, aunque débil, pudiera alcanzar cierta importancia cuando las plantas se encuentren sometidas a

condiciones de estrés. Las plantas de Petunia son huéspedes asintomáticos de *Pythium* (al menos de las tres especies estudiadas y en las condiciones ambientales de los ensayos). Tal coexistencia es el principal peligro por su condición de plantas **portadoras asintomáticas**.

10.-La aplicación del fungicida comercial Aliette®, en las condiciones de los ensayos, no evita la penetración del patógeno y no protege al cultivo. La efectividad del fungicida fosetil-Al en estas condiciones es escasa.

11.-La mayor efectividad del producto se obtiene en aplicaciones tempranas (anteriores a la inoculación con el patógeno) por lo que son recomendables los tratamientos **preventivos** durante las primeras etapas del cultivo en semillero.

12.-Parece existir cierta persistencia en el tiempo del ligero efecto protector del producto obtenido en los primeros momentos de la enfermedad, de modo que el beneficio inicial que proporciona a las plantas se mantiene en fases posteriores.

10. BIBLIOGRAFÍA

ABAD, Z.G. y col.(1994) Characterization and pathogenicity of *Pythium* species isolated from turfgrass with symptoms of root and crown rot in North Carolina. *Phytopathology.*, vol. 84 (9): 913-921 pp.

AGNIHOTRI, V.P. y VAARTAJA, O.(1970) Effect of seed exudates of *Pinus resinosa* on the germination and on the population of *P.irregulare* in the soil. *Plant and soil.* vol. 32 : 246-249 pp.

AGRIOS, G.N.(1988) Fitopatología. Ed. Limusa. Méjico.-756 pp.

AMARAL FRANCO, J.(1964) Gen. *Cupressus*.Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, and Webb DA. *Flora Europaea.* Cambridge Univ. Press. Cambridge. UK. 37-37 pp.

BAILEY, L.H.(1933) Gen. *Petunia*.Mc.Millan. The standard cyclopedia of Horticulture. Mc.Millan. London. vol. 3 : 2563-2565 pp.

BARTHOD, C.(1994) L'état actuel de la santé des forets. *Phytoma- La Défense des végétaux.* vol. 463 : 6-8 pp.

BHATTI, M.A. y KRAFT, J.M.(1992) Effects of Inoculum Density and Temperature on Root Rot an d Wilt of Chickpea. *Plant Disease.* vol. 76 (1): 50-54 pp.

BLACKWELL, E.(1949) Terminology in *Phytophthora.* Commonwealth Mycological Institute. Reino Unido.(30): 1-23 pp.

BLAND, W.L.(1992) Quantifying plant-root development.Singleton LL, Mihail JD, and Rush CM. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Pres. St. Paul. Minn. USA. 225-235 pp.

BLOOMBERG, W.J.(1985) Epidemiology of forest nursery diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* vol. 23 : 83-96 pp.

BOWER, L.A. y COFFEY, M.D.(1985) Development of laboratory tolerance to phosphorous acid, fosetyl-Al, and metalaxyl in *Phytophthora capsici. Can. J. Plant Pathol.* vol. 7 (1): 1-6 pp.

BRASIER, C.M.(1992) Evolutionary biology of *Phytophthora. Annu. Rev. Phytopathol.* vol. 30: 153-171 pp.

BRESINSKY, A.(1983) Sinopsis del Reino Vegetal: eucariotas.Strasburger E, Noll F, Schenck H, and Schimper AFW. Tratado de Botánica. Ed. Marín, S.A. Barcelona. vol. 7 (Parte 3. Cap.2): 635-643 pp.

BRICKELL, C.(1990) Gardeners encyclopedia of plants and flowers. Grijalbo, S.A. Barcelona. 450-554 pp.

CAMPBELL, C.L. y MADDEN, L.V.(1990) Introduction to plant disease epidemiology. Wiley Interscience. New York, USA.-532 pp.

CATALÁN BACHILLER, G.(1991) Semillas de árboles y arbustos forestales. M.A.P.A. Madrid. vol. 1 -392 pp.

CAVALIER-SMITH, T.(1986) The Kingdom Chromista: origin and systematics. *Progress in Phycological Research.* vol. 4 : 309-347 pp.

COFFEY, M.D. y JOSEPH, M.C.(1985) Effects of phosphorous acid and fosetyl-Al on the life cycle of *Phytophthora cinnamomi* and *P.citricola. Phytopathology.* vol. 75 (9): 1042-1046 pp.

COHEN, Y. y COFFEY, M.D.(1986) Systemic fungicides and the control of Oomycetes. *Ann. Rev. Phytopathology.* vol. 24 : 311-338 pp.

COHEN, Y. y col..(1995) Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens. *Phytopathology.*, vol. 85 (12): 1500-1506 pp.

COHEN, Y. y SAMOUCHA, Y.(1984) Cross-resistance to four systemic fungicides in metalaxyl-resistant strains of *Phythophthora infestans* and *Pseudoperonospora cubensis. Plant. Dis.* vol. 68 : 137-139 pp.

COOLEY, S.J.(1987) Management of *Phytophthora* root rot in conifer nurseries of the Pacific Northwest. *Tree Planters Notes.* USA. vol. 38 (4): 37-40 pp.

CHAGNON, M.C. y BELANGER, R.R.(1991) Tolerance in greenhouse geraniums to Pythium ultimum. *Plant Disease.* vol. 75 (8): 820-823 pp.

CHANG, K.F. y col.(1994) Effect of interactions between *Fusarium, Rhizoctonia*, and *Pythium* on root and rhizome rot of *Alstroemeria. Journal of Plant Diseases and Protection.*, vol. 101 (5): 460-466 pp.

CHITTENDEN, F.J.(1951a) Gen. *Petunia.*Cumberlege G. Dictionary of Gardening. Oxford University Press. London. vol. 1 : 1535-1536 pp.

CHITTENDEN, F.J.(1951b) Gen. *Cupressus.*Cumberlege G. Dictionary of Gardening. Oxford University Press. London. vol. 1 : 590-596 pp.

DALLIMORE, W. y JACKSON, A.B.(1966) A handbook of *Coniferae* and *Ginkgoaceae*. Edward Arnold. London.-729 pp.

DARVAS, J.M. y col.(1978) Fungi associated with damping-off in coniferous seedlings in South African nurseries. *South African Forestry Journal.*, vol. 104 : 15-19 pp.

DAUGHTREY, M.L. y col.(1995) Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. APS Press. St. Paul, Minn, USA.

DE LIÑÁN, C.(1996) Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ediciones Agrotécnicas, S.L. Madrid.-588 pp.

DE WAARD, M.A. y VAN ROOIJEN, C.I.(1978) Chemical control of root and crown rot in *Saintpaulia. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* vol. 43 (2): 951-959 pp.

DEACON, J.W.(1979) Cellulose decomposition by *Pythium* and its relevance to substrate-groups of fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* vol. 72 : 469-477 pp.

DICK, M.W.(1990) Keys to *Pythium*. College of Estate Management. Reading. UK.-64 pp.

DOLAN, T.E. y COFFEY, M.D.(1985) *In vitro* and *in vivo* assesment of *Phytophthora palmivora* strains resistant to phosphorous acid. *Phytopathology.* vol. 75 (11): 1330-1330 pp.

DUDEWICZ, E.J. y MISHRA, S.N.(1988) Modern mathematical statistics. J. Wiley & Sons. New York. USA.-298 pp.

DUNCAN, J.M.(1990) *Phytophthora* species attacking strawberry and raspberry. *Bulletin OEPP/EPPO.*(20): 107-115 pp.

EDGINGTON, L.V.(1981) Structural requirements of systemic fungicides. *Ann. Rev. Phytopathology.*(19): 107-124 pp.

EDMONDS, R.L. y HEATHER, W.A.(1973) Root diseases in pine nurseries in the Australian Capital Territory. *Plant Disease Reporter.* vol. 57 (12): 1058-1062 pp.

EHRENDORFER, F.(1986) Sinopsis de reino vegetal. Eucariotas. Espermatófitos. Gimnospermas.Strasburger E, Noll F, Schenck H, and Schimper AFW. Tratado de Botánica. Ed. Marín, S.A. Barcelona. vol. 7 (2): 784-784 pp.

ENGELHARD, A.W.(1992) Efficacy of fosetyl-Al for control of *Pythium* root rot on *Dianthus, Petunia, Poinsettia* and *Verbena. Phytopathology.* vol. 82 (7): 608

FARR, D.F. y col.(1989) Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press. St. Paul.-34 pp.

FAVRIN, R.J. y col.(1988) *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumbers in British Columbia greenhouses. *Plant Disease.*, vol. 72 (8): 683-687 pp.

FENN, M.E. y COFFEY, M.D.(1985a) Further evidence for the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology.* vol. 75 (9): 1064-1068 pp.

FENN, M.E. y COFFEY, M.D.(1985b) Fosetyl-Al and phosphorous acid, Direct or indirect mode of action? *Phytopathology.* vol. 75 (11): 1330

FERRIN, D.M. y WADSWORTH, M.L.(1992) Effect of metalaxyl on sporulation and growth of metalaxyl-resistant and metalaxyl-sensitve isolates of *Phytophthora parasitica* "in vitro". *Plant Disease.* vol. 76 (5): 492-495 pp.

FREZZI, M.J.(1956) Especies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas.* vol. 10 (2): 113-241 pp.

GELLINI, R.(1976) Caratteri botanici e colturali del cipresso.Cassa di Risparmo. Del cipresso. Cassa di Risparmo. Firenze.

GILL, D.L.(1977) Root and Crown Rot of Shore Juniper (Juniperus conferta): Cause and Control. *Plant Disease Reporter.* vol. 61 (7): 584-587 pp.

GÓMEZ-LIMÓN, M.C.(1996) Hongos del suelo y nematodos en tabaco. Universidad Politécnica de Madrid. 1-277 pp.

GOODWIN, S.B. y MCGRATH, M.T.(1995) Insensitivity to metalaxyl among isolates of *Phytophthora erythroseptica* causing pink rot of potato in New York. *Plant Disease.* vol. 79 : 967

GRIFFIN, D.M.(1965) A study of damping-off, root damage and related phenomena in coniferous seedlings in British forest nurseries. Bull.For.Commn. London. vol. 1 (37): 212-227 pp.

HALL, G.(1993) Identification of *Pythium & Phytophthora* species. International Mycological Institute. Egham. UK. 1-32 pp.

HANCOCK, J.G. y HUISMAN, O.C.(1981) Nutrient movement in host-pathogen systems. *Ann. Rev. Phytopathol.*(19): 309-331 pp.

HANSEN, E.M. y col.(1979) Isolation, incidence and management of *Phytophthora* in forest tree nurseries in the Pacific NorthWest. *Plant Disease Reporter.*, vol. 63 (7): 607-611 pp.

HANSEN, E.M. y LEWIS, K.J.(1997) Compendium of conifer diseases. APS Press. St. Paul, Minnesota. vol. 1 -101 pp.

HARTZ, T.K.(1994) Minimizing environmental stress in field establishment of vegetable crops in the Southwestern United States. *HortTechnology.* Virginia,USA. vol. 4 (1): 29-34 pp.

HAUSBECK, M.K. y col.(1989) Damping-off, root rot, and lower stem rot of seed-propagated geraniums caused by *Pythium ultimum. Plant Disease.*, vol. 73 (8): 625-627 pp.

HENDRIX, F.F. y CAMPBELL, W.A.(1966) Root rot organisms isolated from ornamental plants in Georgia. *Plant Disease.* vol. 50 (6): 393-395 pp.

HENDRIX, F.F. y CAMPBELL, W.A.(1968) Pythiaceous fungi isolated from Southern forest nursery soils and their pathogenicity to pine seedlings. *Forest science.* vol. 14 (3): 292-297 pp.

HENDRIX, F.F. y CAMPBELL, W.A.(1973) *Pythiums* as plant pathogens. *Ann. Rew. of Phytopathology.* vol. 11 : 77-98 pp.

HENDY, A. y ROBERTS, G.(1974) Recognising the diseases in bedding plants. *Commercial Grower.* UK.(4091): 925-928 pp.

HERNÁNDEZ, J. y col.(1998) Plagas y enfermedades forestales. *Sustrai.*(38): 58-61 pp.

HEYWOOD, V.H.(1964) Fam. *Cupressaceae.* En Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, and Webb DA. *Flora Europaea.* Cambridge Univ. Press. Cambridge. UK. 36-37 pp.

HODGES, C.F. y COLEMAN, L.W.(1985) *Pythium*-induced root dysfunction of secondary roots of *Agrostis palustris. Plant Disease.* vol. 69 (4): 336-340 pp.

HUANG, J.W. y KUHLMAN, E.G.(1990) Fungi associated with damping-off of Slash Pine seedlings in Georgia. *Plant Disease.* vol. 74 (1): 27-30 pp.

JACQUIN, D. y CHAUVEL, G.(1993) État sanitaire des végétaux forestiers et d'ornement. *Phytoma- La Défense des végétaux.*(450): 37-41 pp.

JAMART, G. y col.(1983) Chemical control of damping-off of seedling bedding plants by *Pythium* species. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, vol. 48 (3): 775-782 pp.

JAMES, R.L.(1985) Diseases associated with containerized seedling soil mixes. *Tree Planters Notes.* UK? vol. Spring (1985): 3-5 pp.

JEFFERS, S.N. y MARTIN, S.B.(1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease.* vol. 70 (11): 1038-1043 pp.

JOHNSON, D.W. y ZAK, B.(1977) Effects of soil treatments on fungal populations and Ponderosa Pine seedling survival in an Oregon nursery. *Plant Disease Reporter.* vol. 61 (1): 43-47 pp.

JOUSTRA, M.A.(1983) Wortelbrand of omvalziekte (Podredumbre de raiz). *Landbouwkundig Tidjschrift.* vol. 95 (4): 21-25 pp.

KANNWISCHER, M.E. y MITCHELL, D.J.(1978) The influence of a fungicide on the epidemiology of Black Shank of tobacco. *Phytopathology.* vol. 68 : 1760-1765 pp.

KATAN, J.(1981) Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pest. *Ann. Rev. Phytopathology.* vol. 19 : 211-236 pp.

KEIM, R. y col.(1978) Pathogenicity, characteristics, and host range of the fungus *Pythium irregulare* Buis. in a container nursery in Southern California. *Hortscience.*, vol. 13 (3): 295-296 pp.

KENERLEY, C.M. y PAPKE, K.B., R.J.(1984) Effect of flooding on development of Phytophthora root rot in Fraser fir seedlings. *Phytopathology.* vol. 74 (4): 401-404 pp.

KOSTER, A.T.J. y DE ROOIJ, M.(1980) New possibilities for chemical control of root rot *(Pythium* spp.) in cultivation of bulbs and bulb flowers. *Acta Hort.* vol. 109 : 375-380 pp.

LAFFRANQUE, J.P. y col.(1993) Le diméthomorphe. *Phytoma.*, vol. 448 : 49-51 pp.

LARKIN, R.P. y col.(1995) Effects of infection by *Pythium* spp. on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology.*, vol. 85 (4): 430-435 pp.

LAZAROVITS, G.(1985) Influence of pyroxyfur seed treatment, inoculum density, and low level cultivar resistance on *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* rot of soybean. *Can. J. Plant Pathol.* vol. 7 : 370-376 pp.

LITTLE, T.M. y HILLS, F.J.(1976) Métodos estadísticos para la investigación en Agricultura. Trillas. Méjico.-200 pp.

LOCK, W. y col.(1975) Fungicide treatment of seeds for damping-off control in British Columbia forest nurseries. *Tree Planters Notes.*: 16-28 pp.

LÓPEZ GONZÁLEZ, G.(1993) Fam. *Cupressaceae*.Incafo SL. La guía Incafo de los árboles y arbustos de la península ibérica. Incafo, S.L. Madrid. vol. 4 : 389-408 pp.

LUMSDEN, R.D. y col.(1976) Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. *Phytopathology.*, vol. 66 : 1203-1209 pp.

LYMAN, R.(1993) An introduction to statistical methods and data analysis. Wadsworth, Inc. USA. vol. 4ª -1051 pp.

MACDONALD, J.D.(1982) Effect of salinity stress on the development of Phytophthora root rotof Chrysanthemun. *Phytopathology.* vol. 72 : 214-219 pp.

MARTIN, F.N.(1992) *Pythium*.Singleton LL, Mihail JD, and Rush CM. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press. St. Paul. vol. 1 : 39-49 pp.

MELLANO, H.M. y col.(1970) Relationship of seedling age to development of *Pythium ultimum* on roots of *Antirrhinum majus. Phytopathology.*, vol. 60 : 935-942 pp.

MIDDLETON, J.T.(1943) The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium. Mem. Torrey Botanical Club.* vol. 20 -171 pp.

MIMAUD, J.(1996) Au jardin problèmes techniques, plus spécialement phytosanitaires. *Phytoma - La Défense des Végétaux.* vol. 480 : 40-43 pp.

MITCHELL, D.J. y KANNWISCHER-MITCHELL, M.E.(1992) *Phytophthora*.Singleton LL, Mihail JD, and Rush CM. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press. St. Paul. USA. vol. 1 : 31-38 pp.

MITCHELL, D.J.(1978) Relationships of inoculum levels of several soilborne species of Phytophthora and Pythium to infection of several hosts. *Phytopathology.* vol. 68 : 1754-1759 pp.

MOORE, D.M.(1964) Fam. *Solanaceae.*Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, and Webb DA. *Flora Europaea.* Cambridge University Press. Cambridge. 193-193 pp.

MOORMAN, G.W.(1986) Increased plant mortality caused by *Pythium* root rot of Poinsettia associated with high fertilisation rates. *Plant Disease.* vol. 70 (2): 160-162 pp.

MOULIN, F. y col.(1994) Pathogenicity of *Pythium* species on cucumber in peat-sand, rockwool and hydroponics. *European Journal of Plant Pathology.*, vol. 100 : 3-17 pp.

MOULIN, F. y col.(1996) *Pythium aphanidermatum* responsible for root damages and yield reduction in soilless cultures of cucumber. *IOBC wprs Bulletin.*, vol. 19 (6): 12-18 pp.

NEERGAARD, P.(1979) Seed Pathology. Mc.Millan. London.-839 pp.

NELSON, E.B. y HSU, J.S.T.(1994) Nutritional factors affecting responses of sporangia of *Pythium ultimum* to germination stimulants. *Phytopathology.* vol. 84 (7): 677-683 pp.

PAWUK, W.H.(1979) *Pythium* control for container-grown Longleaf Pine seedlings. *Tree Planters Notes.* USA.(1979): 7-10 pp.

PERRIN, R. y SAMPANGI, R.(1986) La fonte des semis en pépinière forestière. *Eur. J. For. Path.* vol. 16 : 309-321 pp.

PHILLIPS, D.H. y BURDEKIN, D.A.(1982) Diseases of forest and ornamental trees. McMillan Press. London. vol. 1 (1)-435 pp.

RAABE, R.D. y col.(1972) *Pythium* root rot of Gerbera and its control. *Californian Plant Pathology.*(8): 4-6 pp.

RAM REDDY, M.A. y col.(1964) Growth of *Picea sitchensis* in old forest nurseries. *Ann. appl. Biol.*, vol. 54 : 397-414 pp.

RATTINK, H.(1996) Root pathogens in modern cultural systems. Assessment of risks and suggestions for integrated control. *IOLB wprs Bulletin.* vol. 19 (6): 1-10 pp.

REY, P. y col.(1996) *Pythium* F in soiless cultures: detection, colonization and incidence on tomato roots. *IOBC wprs Bulletin.*, vol. 19 (6): 19-25 pp.

RISTAINO, J.B.(1991) Influence of rainfall, drip irrigation, and inoculum density on the development of *Phytophthora* root and crown rot epidemics and yield in bell pepper. *Phytopathology.* vol. 81 (8): 922-929 pp.

RONCADORI, R.W. y MCCARTER, S.M.(1971) Effect of soil treatment, soil temperature, and plant age on *Pythium* root rot of cotton. *Phytopathology.* vol. 62 : 373-376 pp.

SALT, G.A.(1979) The increasing interest in "minor pathogens".Schippers B and Gams W. Soilborne plant pathogens. Academic Press. New York. vol. 1

SHARMA, J.K. y MOHANAN, C.(1992) Effect of some nursery practices on incidence and severity of diseases, and growth of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Eur. J. For. Path.* vol. 22 : 125-135 pp.

SMITH, D.(1993) Notes on the preservation of fungi. IMI. Egham, UK.-37 pp.

SMITH, L.D.(1981) Chemical control of *Phytophthora* root and crown rot of *Petunia. Phytopathology.* vol. 71 (2): 256

SMITH, M.A.L. y NEELY, D.(1981) Screening woody ornamental cuttings for resistance to propagation disease. *Phytopathology.* vol. 71 (2): 256

SOLDEVILLA, C.(1995) Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas.* vol. 21 : 87-109 pp.

SOLER, J.M. y col.(1997) Aliette:Protección de las enfermedades de los frutos cítricos. Phytoma España., vol. 90 : 55-58 pp.

SOUTHERN, J.W. y col.(1976) Comparative pathogenicity of *Pythium myriotylum* and *P. irregulare* to the soybean cultivar Bragg. *Phytopathology.*, vol. 66 : 1380-1385 pp.

STAMPS, D.J. y col.(1990) Revised tabular key to the species of *Phytophthora.* CAB International. Oxon. UK., vol. 2 (162)-28 pp.

STANGHELLINI, M.E. y HANCOCK, J.G.(1971) The sporangium of *Pythium ultimum* as a survival structure in soil. *Phytopathology.* vol. 61 : 157-164 pp.

STANGHELLINI, M.E. y KRONLAND, W.C.(1986) Yield loss in hydroponically grown lettuce attributed to subclinical infection of feeder rootlets by *Pythium dissotocum. Plant Disease.* vol. 70 : 1053-1056 pp.

STATSOFT INC.(1993) Manual de Statistica. Statsoft Inc. USA.

TUSET, J.J. y HINAREJOS, C.(1995) Enfermedades del ciprés. Madrid.-70 pp.

VAARTAJA, O. y AGNIHOTRI, V.P.(1968) Seed exudates from *Pinus resinosa* and their effects on growth and zoospore germination of *Pythium afertile. Can Journal Botany.* vol. 46 : 1135-1141 pp.

VAARTAJA, O.(1975) *Pythium sylvaticum* in Canadian forest nurseries. *Can. Plant Dis. Surv.* vol. 55 : 101-102 pp.

VAN DER PLAATS-NITERINK, S.J.(1981) Monograph of the genus *Pythium*. Centraalbureau Voor Schimmercultures. Inst. R. Neth. Acad. Sci. Lett. Baarn-Netherlands.(21)-242 pp.

VEGH, I. y col.(1994) Mise au point sur la lutte chimique contre *Phytophthora cinnamomi* Rands.. *Phytoma- La Défense des végétaux.*(458): 50-52 pp.

VEGH, I. y LE BERRE, A.(1985) Quelques maladies nouvelles a *Phytophthora* des arbustes d'ornement en France. *Rev. Hortic.* vol. 258 : 35-39 pp.

WAARD, M.A.D.(1993) Management of resistance to pesticides.Zadocks JC. Modern Crop Protection: Developments and Perspectives. Wageningen Pers. Wageningen. The Netherlands.-309 pp.

WATERHOUSE, G.M.(1970) The genus *Phytophthora* de Bary. CAB. UK.(122)-59 pp.

WATERHOUSE, G.M.(1971) Phycomycetes.Booth C. Methods in Microbiology. Academic Press. Londres. UK.-795 pp.

WHITE, G. y WAKEHAN, A.(1996) *Pythium* species in the bedding plant industry. *HDC Proyect news.* vol. 97 : 18-19 pp.

WONG, D.H. y col.(1984) Effects of soil temperature and moisture on the pathogenicity of fungi associated with root rot of Subterranean Clover. *Aust. J. Agric. Res.*, vol. 35 : 675-684 pp.

XI, K. y col.(1995) Dynamics of Pea seed infection by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*: Effects of inoculum density and temperature on seed rot and pre-emergence damping-off.. *Can. J. Plant Pathol.*, vol. 17 : 19-24 pp.

11. RESUMEN

La producción y cultivo de plantas ornamentales en la Comunidad de Madrid implica a un número importante de empresas (126 según datos de febrero de 1998) que producen fundamentalmente coníferas y otros árboles y arbustos para jardinería, así como plantas anuales y aromáticas. Tales producciones están afectadas por problemas sanitarios diversos, destacando entre los más graves y numerosos, las alteraciones que se pueden englobar dentro de la denominación "*enfermedades del suelo*".

A finales de 1991 comenzamos un estudio sobre estas alteraciones que duraría tres años y medio, y donde analizamos 125 consultas de 41 géneros vegetales distintos procedentes, en su mayoría, de 16 viveros de la región y, en menor proporción, de parques y jardines públicos y privados. Se procedió a la identificación de los agentes patógenos y a su aislamiento en el caso de los hongos de la familia *Pythiaceae* y del género *Fusarium*. El resultado del diagnóstico fue que un 42% de las alteraciones estaban causadas por "*hongos del suelo*". De ellos, los principales patógenos pertenecían a la familia *Pythiaceae* (85%) y, dentro de ella, el género *Pythium* representó un 64% de los aislamientos. Las tres especies más frecuentemente encontradas fueron: *Pythium irregulare* Buisman (32%), *Pythium paroecandrum* Drechsler (21%) y *Pythium intermedium* de Bary (13%). Mantenemos una micoteca de más de 50 aislamientos distintos de *Pythium*.

Los huéspedes más afectados por especies de *Pythium* fueron plantas de los géneros *Cupressus* y *Pyracantha*, pero también resultaron dañadas otras coníferas, aromáticas y arbustos de exterior.

Se confirmó la patogenicidad de varios de los aislamientos de *Pythium* obtenidos; se comparó su virulencia y el efecto de tres concentraciones de inóculo. Las tres especies de *Pythium* se comportaron de forma similar, provocando una mortalidad muy elevada (superando incluso el 90% a las seis semanas de la inoculación en algunos casos), una reducción en el crecimiento de las plantas supervivientes, principalmente del sistema radicular, y necrosis en las raíces.

De las tres especies de *Pythium* mayoritarias se eligieron los tres aislados más virulentos para los estudios posteriores. En primer lugar, se estudió la incidencia de la enfermedad en relación a la edad del huésped. Se realizaron ensayos en condiciones controladas y en umbráculo al aire libre. La planta utilizada como huésped fue *C.arizonica* Greene.

En ambiente controlado en semillero, se comparó el efecto de la inoculación artificial sobre plántulas de 2 y 6 semanas de edad desde la emergencia. La inoculación sobre las plantas más jóvenes incrementó la mortalidad en las primeras semanas, pero esta diferencia tendió a desaparecer en semanas posteriores.

En los ensayos de campo se reprodujeron lo más posible las condiciones reales de cultivo en los viveros de la zona. Se inoculó artificialmente en seis momentos distintos durante los dos primeros años de vida de las plantas, desde la emergencia en semillero y antes y después del transplante en macetas. La incidencia de la enfermedad fue mayor en las inoculaciones sobre planta más joven y disminuyó a medida que aumentaba la edad del huésped. El transplante no conllevó una mayor sensibilización del huésped ante el ataque de *Pythium*.

Los mismos tres aislados fueron capaces de penetrar las raíces de un huésped distinto, *Petunia*, pero con distinta expresión de la enfermedad, pues no produjeron la muerte de las plantas, ni síntomas aparentes de daño. Ocasionalmente pudieran tener algún efecto sobre el crecimiento de las plantas y producir una leve clorosis en las hojas.

Por último, se evaluó la efectividad del control químico, profusamente utilizado por los productores de la Comunidad de Madrid, centrado en el producto más empleado, el fosetil-Al. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas con inoculaciones artificiales sobre plántulas de semillero de *C.arizonica* Greene y con el fungicida Aliette®, a la dosis máxima indicada por el fabricante y en una sola aplicación, en distintos momentos antes y después de la inoculación. El producto resultó poco efectivo bajo tales condiciones. Las aplicaciones preventivas, efectuadas antes o justo en el momento de la inoculación con el patógeno, parecen ser las más eficaces. El fungicida tiende a estimular el crecimiento de las plantas sanas.

12. SUMMARY

In the Comunidad de Madrid a large number of nurseries produce ornamental plants (126 according to February 1998 figures). These plants are mainly conifers and other trees and shrubs for gardening, as well as annuals and aromatic plants. They are affected by diverse health problems, one of the most severe and numerous of which is the so called "soil diseases".

At the end of 1991 we started a three-and-a-half year study of those diseases. One hundred and twenty five samples were analysed including 41 different plant genera, mainly taken from 16 nurseries in the Madrid area. We also worked on samples taken from public and private parks and gardens. Pathogens were identified and fungi isolated when they belonged to *Pythiaceae* or *Fusarium* groups.

The "soil-borne fungi" produced 42% of the diseases. Of these, soil-borne *Pythiaceous* fungi were most frequently isolated (85%), *Pythium* being the most abundant genus (64%). Three species were predominant, *P.irregulare* Buisman (32%), *P.paroecandrum* Drechsler (21%) y *P.intermedium* de Bary (13%). In our fungal collection more than 50 isolates of *Pythium* are kept.

The hosts more affected by *Pythium* spp. were of the genera *Cupressus* and *Pyracantha*, but also affected were the conifers, aromatics and shrubs.

The pathogenicity of various *Pythium* isolates was confirmed. Their virulence and the effect of various concentrations of inoculum were compared. The three species of *Pythium* behaved in similar ways, producing high levels of plant death (more than 90% in some cases), a reduction in growth of surviving plants and root necrosis.

Of the three most common species of *Pythium*, the three most virulent isolates were chosen for further studies. Firstly, the disease incidence in relation to the age of the host was studied. Tests in controlled conditions and in open air shadehouses were performed. The plants used as hosts were *Cupressus arizonica* Greene.

In the controlled environment in growth chambers, the effect of artificial inoculation on plantlets of either 2 or 6 weeks from emergence was studied. Inoculation of the youngest plants (2 weeks) increased mortality in the first weeks after inoculation when compared to inoculation of the oldest ones (6 weeks), but this difference tended to disappear in later weeks.

In the field trials, the most realistic conditions relative to the nurseries in the area were reproduced. During the first 2 years of growth the plants were inoculated artificially at 6 different times, from emergence in seedtrays to before and after transplanting to pots. Disease incidence was greater when young plants were inoculated and decreased in relation to the age of the host plants. Transplanting did not cause an increased host sensitivity to *Pythium* attack.

The same three isolates were capable of penetrating the roots of a different host, *Petunia*, but with different disease expression since they did not produce plant death or visible signs of damage. Occasionally they could affect plant growth and produce weak foliar chlorosis.

Finally, the effectiveness of chemical control was evaluated. Fosetyl-Al, as the most common example used profusely by the nurserymen in Madrid, was focused on for these studies which were carried out in controlled conditions. Seedlings of *C.arizonica* Greene were inoculated artificially and treated with a single application of Aliette® at the maximun dose recommended by the manufacturer. Aliette® treatments were applied at various moments before and after the inoculation with the pathogen. This fungicide proved of little effectiveness under these conditions. The preventive treatments appeared more successful. The fungicide tended to stimulate the growth of healthy uninoculated plants.

13. ANEJOS

13.1 CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS DE LOS SUSTRATOS

Se envió una muestra de las mezclas utilizadas en los ensayos para su análisis al Laboratorio Central de El Encín, con el siguiente resultado:

Sustrato para ensayos en condiciones controladas

Mezcla sustrato Brill nº1 y vermiculita en proporción 1:1 (v/v), después del autoclavado:

pH: 6,0
CE (µmh/cm): 2030
MO: 42,31%
C/N: 24
d_r: 1,7 g/ml
d_a: 0,252 g/ml
Carbonatos: 2,8%
Nitrógeno: 1,02%
Fósforo: 450 ppm
Calcio: 17190 ppm
Magnesio: 433 ppm
Sodio: 1241 ppm
Potasio: 1957 ppm

Sustrato para semillero en ensayos de campo

Mezcla sustrato Brill nº1 y tierra procedente del vivero comercial "Puerta de Hierro" en proporción 1:4 (v/v), después del autoclavado:

pH: 7,8
CE (µmh/cm): 1658
MO: 5,26%
C/N: 17
d_r: 2,58 g/ml
d_a: 1,056 g/ml
Carbonatos: 2,8%
Nitrógeno: 0,18%
Fósforo: 100 ppm
Calcio: 9720 ppm
Magnesio: 214 ppm
Sodio: 822 ppm
Potasio: 488 ppm

Sustrato para transplante en ensayos de campo

Mezcla sustrato Brill nº1 y arena de río lavada en proporción 8:1 (v/v), después del autoclavado:

pH: 7,1
CE (µmh/cm): 364
MO: 9,36%
C/N: 27
d_r: 1,183 g/ml
d_a: 0,664 g/ml
Carbonatos: 0,4%
Nitrógeno: 0,20%
Fósforo: 60 ppm
Calcio: 8210 ppm
Magnesio: 323 ppm
Sodio: 901 ppm
Potasio: 433 ppm

13.2 DATOS METEOROLÓGICOS

Levenda:
tm = Temperatura media mensual (en °C).
Tmmax = Temperatura máxima media (en °C).
Tmax = Temperatura máxima absoluta (en °C).
tmmin = Temperatura mínima media (en °C).
tmin = Temperatura mínima absoluta (en °C).
HRm = Humedad Relativa media (en %).

Los datos meteorológicos que se presentan en las siguientes tablas y figuras pertenecen al observatorio meteorológico que se encuentra en los campos de prácticas de la E.T.S.I. Agrónomos (Estación de Botánica Agrícola)

Tabla 13.2.1.-Datos meteorológicos en los años del ensayo.

A) 1992.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	1,8	4,1	8,7	11,9	15,2	16,4	24,2	22,5	17,7	11,5	8 4	6,0	12.4
Tmmax	9,2	13,2	17,1	20,0	24,7	22,7	32,8	31,8	27,9	17,1	16 5	10.9	20.3
Tmax	14,2	20,3	25,9	27,5	31,1	31,1	37,7	38,2	34,2	26,4	21.8	14,4	38,2
tmmin	-4,3	-3,2	0,4	3,6	9,7	10,2	15,1	13,4	8,1	6,4	2.0	1,7	5.2
tmin	-8,4	-8,2	-4,4	-2,4	4,5	4,6	10,7	7,8	0,0	-2,0	-2 9	-6,9	-8.4
HRm	79,8	72,3	59,1	55,9	49,6	62,3	41,0	49,8	55,1	79,3	85.2	88,0	64,8
HRmmax	98,5	98,3	93,2	91,5	87,3	94,5	75,2	87,7	88,7	97,3	99.6	99,0	92,6
HRmax	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100.0	100,0	100,0
Hrmmin	50,6	35,8	29,1	27,6	27,0	33,4	17,7	19,6	21,6	53,4	52 9	64,7	36,1
HRmin	28,0	11,0	10,0	10,0	9,0	14,0	10,0	10,0	9,0	23,0	32.0	31,0	9,0
Pm	6,2	27,2	13,0	40,4	37,4	70,8	13,4	33,6	22,2	82,6	3 8	25,0	375,6

B) 1993.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	2,0	5,6	8,5	10,4	14,0	19,4	23,6	23,1	16,4	10,5	6 5	5.2	12,1
Tmmax	11,3	12,3	16,3	17,4	20,6	26,8	32,6	31,9	24,4	15,2	12.6	10,8	19,3
Tmax	16,0	19,7	23,4	25,1	27,3	33,7	38,5	39,9	32,6	22,6	17 2	15,7	39,9
tmmin	-4,1	-0,4	1,4	3,3	7,5	11,9	14,5	13,8	9,2	6,5	1.4	0,9	5,5
tmin	-8,7	-7,7	-9,4	-1,9	1,4	5,7	9,9	6,3	0,9	-2,1	-6.3	-7,6	-9,4
HRm	85,7	68,8	66,3	63,1	70,5	60,6	39,0	41,1	56,7	83,2	90.2	87,9	67,8
HRmmax	99,9	92,4	97,0	95,4	99,9	95,9	71,7	75,3	90,6	97,9	100,0	97,7	92,8
HRmax	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100 0	100,0	100,0
Hrmmin	51,1	39,9	33,7	31,5	36,2	30,3	16,9	16,4	27.0	59,6	65.4	67,9	39,7
HRmin	17,0	6,0	10,0	11,0	17,0	14,0	7,0	7,0	17,0	28,0	12.0	26,0	6,0
Pm	0,6	41,4	30,2	20,2	82,6	103,2	0,0	7,6	7,2	203,4	33.2	0,8	530,4

C) 1994.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	4,2	5,3	11,2	10,9	15,6	21,5	25,2	24,0	16,9	13,5	8,6	4,9	13,5
Tmmax	10,9	12,1	20,2	18,2	22,5	30,0	35,0	33,5	24,6	20,1	16,2	11,5	21,2
Tmax	17,2	18,1	25,6	28,5	31,9	38,6	37,5	37,0	32,4	25,8	20,3	20,5	38,6
tmmin	-1,4	-0,6	1,8	3,4	8,6	12,1	14,2	14,0	9,4	8,1	3,0	-0,6	6,0
tmin	-7,5	-7,7	-1,7	-4,3	4,2	6,3	10,8	10,4	1,7	1,4	-2,5	-9,9	-9,9
HRm	80,5	80,5	66,0	54,2	66,2	38,9	32,9	39,2	53,0	82,7	90,4	89,6	64,5
HRmmax	97,9	100,0	98,6	87,1	96,5	74,7	70,8	75,7	85,3	99,2	100,0	99,4	90,4
HRmax	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Hrmmin	50,8	46,8	27,8	25,1	35,2	16,2	9,6	13,2	25,0	47,9	61,5	63,5	35,2
HRmin	23,0	15,0	15,0	3,0	14,0	7,0	2,0	3,0	5,0	24,0	33,0	27,0	2,0
Pm	21,8	30,2	0,0	31,2	58,4	0,0	14,0	0,0	11,6	31,6	28,0	3,6	230,4

D) 1995

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	5,0	7,2	9,8	12,5	18,1	21,5	24,5	23,5	16,7	14,7	9,8	7,2	14,2
Tmmax	11,8	14,1	18,2	21,4	25,6	28,9	33,0	32,2	24,4	23,4	15,8	11,2	21,7
Tmax	16,2	20,7	23,1	28,5	31,2	33,7	41,5	36,1	32,3	29,7	23,8	15,4	41,5
tmmin	-0,9	1,3	1,2	3,4	10,2	13,6	15,6	15,0	9,2	7,5	4,8	3,8	7,1
tmin	-7,6	-4,8	-4,4	-3,2	0,2	5,7	11,3	9,4	1,0	2,3	-0,6	-3,8	-7,6
HRm	81,4	79,1	52,2	43,8	41,0	43,4	35,0	37,6	52,5	69,3	84,7	91,3	59,3
HRmmax	98,6	96,1	91,8	82,5	81,7	83,4	78,9	79,5	93,5	99,6	100,0	100,0	90,5
HRmax	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Hrmmin	50,6	47,0	18,9	13,4	13,5	14,8	8,5	8,8	16,9	23,6	56,0	65,7	28,1
HRmin	9,0	12,0	2,0	2,0	1,0	4,0	1,0	1,0	3,0	7,0	12,0	10,0	1,0
Pm	25,4	46,8	2,6	14,4	20,8	92,0	3,4	18,6	24,6	7,4	73,0	100,6	429,6

Los datos meteorológicos que se presentan en las siguientes tablas y figuras pertenecen al observatorio meteorológico que se encuentra en Madrid (Retiro).

Tabla 13.2.2.- Datos meteorológicos en los años de recogida de muestras.

A) 1991.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	5,6	5,9	10,4	11,8	16,0	23,5	26,5	27,3	21,9	12,3	9,4	7,1	14,8
Tmmax	8,5	9,4	14,1	17,2	22,5	30,3	33,3	34,0	27,3	16,0	13,0	10,3	19,7
Tmax	12,2	17,2	21,5	24,5	29,6	37,5	39,1	39,4	33,8	25,4	18,2	17,0	39,4
tmmin	2,6	2,3	6,7	6,4	9,4	16,6	19,7	20,5	16,5	8,5	5,8	3,9	9,9
tmin	-2,0	-3,6	3,4	1,4	1,9	10,6	13,2	14,3	8,4	3,6	2,5	0,0	-3,6
HRm	70	69	67	48	37	33	33	31	49	62	65	68	53

B) 1992.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	4,6	7,4	11,5	14,1	18,5	17,4	26,3	25,4	20,8	13,1	11,2	7,3	14,8
Tmmax	8,2	12,3	16,7	19,9	24,1	22,1	32,8	31,7	26,9	16,6	15,3	10,0	19,7
Tmax	12,1	17,3	25,9	27,3	31,7	30,6	37,9	37,9	33,1	25,2	20,2	13,4	37,9
tmmin	1,0	2,6	6,3	8,3	12,9	12,8	19,8	19,2	14,8	9,5	7,1	4,7	9,9
tmin	-2,5	-1,2	1,5	1,5	6,0	9,2	14,0	12,2	8,0	3,4	2,3	-2,2	-2,5
HRm	67	56	50	48	48	55		36	54	69	68	72	

C) 1993

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	6,0	7,1	11,0	12,0	15,6	21,0	25,0	26,5	18,6	11,3	8,8	6,4	14,4
Tmmax	10,5	11,2	16,3	17,2	20,6	26,5	33,1	37,2	24,0	14,5	12,1	9,6	19,4
Tmax	14,5	18,0	23,0	25,4	26,5	33,1	38,7	40,0	32,4	22,2	18,8	14,0	40,0
tmmin	1,6	3,0	5,6	6,7	10,5	15,5	16,8	15,8	13,3	8,1	5,5	3,3	8,8
tmin	-3,1	-2,2	-3,8	2,2	4,3	10,8	11,1	11,1	7,5	1,8	-0,6	-0,9	-3,8
HRm	68	58	53	54	59	51	43	42	48	76	77	78	59

D) 1994

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	6,0	7,1	13,9	12,2	16,8	22,7	27,4	26,4	18,6	15,3	11,4	7,3	15,4
Tmmax	10,0	11,4	19,6	17,9	22,1	29,3	34,6	32,8	23,8	19,0	14,9	10,5	20,5
Tmax	15,2	18,0	25,5	28,2	31,2	38,0	36,9	36,5	32,0	24,5	19.0	17,7	38,0
tmmin	2,1	2,8	8,0	6,3	11,6	16,1	20,3	20,0	13,4	11,6	7,8	4,1	10,3
tmin	-2,3	-2,7	3,9	0,0	7,1	9,9	18,6	15,8	7,8	7,5	3,0	-3,4	-3,4
HRm	69	61	55	52	58	44	41	47	58	72	80	78	60

Los datos meteorológicos que se presentan en las siguientes tablas y figuras pertenecen al observatorio meteorológico que se encuentra en Colmenar Viejo (B.A. Helicopteros).

Tabla 13.2.3.- Datos meteorológicos en los años de recogida de muestras.

A) 1991.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	3,5	3,9	8,2	9,7	13,3	21,0	24,0	25,5	20,1	10,3	8,1	7,1	12,9
Tmmax	6,4	7,3	11,7	14,8	19,7	27,7	30,5	31,5	25,3	14,0	11,2	9,7	17,5
Tmax	10,2	15,4	19,2	21,5	27,5	34,0	35,5	36,2	32,6	24,5	16,5	19,0	36,2
tmmin	0,5	0,5	4,6	4,6	6,8	14,4	17,4	19,4	14,9	6,5	4,9	4,3	8,2
tmin	-4,2	-4,9	1,0	-1,0	0,0	7,0	10,5	10,0	6,0	0,0	-0.4	2,0	-4,9
HRm	83	80	79	65	54	49	43	40	59	79	78	79	66

B) 1992.

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	4,2	6,8	10,4	12,0	17,2	15,8	24,3	23,8	19,5	11,0	10,8	5,7	13,5
Tmmax	7,6	10,8	15,0	17,0	22,6	20,3	30,4	29,6	25,2	14,5	14,9	9,0	18,1
Tmax	12,0	18,5	24,5	24,0	29,5		36,0	36,0	31,0		21,3		
tmmin	0,9	2,9	5,7	7,0	11,8	11,2	18,2	17,9	13,8	7,5	6,7	2,4	8,8
tmin	-5,0	-2,5	-0,2	0,2	4,0		11,5	10,5	5,0		3,1		
HRm	80	64	59	57	59	64	52	49	54	75	74	81	64

C) 1993

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	6,1	5,7	8,8	9,7	13,2	19,4	23,0	24,0	16,4	9,2	7,2	6,0	12,4
Tmmax	9,9	9,4	13,1	14,4	17,7	28,8	29,9	30,2	21,7	17,4	13,7	9,1	18,4
Tmax	15,0	18,2	19,5	22,0	24,5	30,5	35,7	36,6	30,0	20,5	15,0	15,0	36,6
tmmin	2,3	2,0	4,4	5,0	8,6	10,0	16,1	17,9	11,3	5,8	4,2	2,5	7,5
tmin		-4,0	-6,0	0,2	3,0	9,0	8,5	6,9	5,5	1,5	-1,0	-2,0	
HRm	69	66	61	61	65	52	41	40	51	80	82	81	62

D) 1994

	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Anual
tm	4,9	5,8	12,0	9,8	14,7	20,2	25,8	24,8	16,5	13,8	10,4	6,0	12.4
Tmmax	8.4	9,6	17,1	15,2	19,4	26,5	32,1	30,6	21,7	17,4	13,7	9,1	18,4
Tmax	15,0	15,2	22,0	25,5	28,0	34,5	34,1	34,0	29,5	22,7	18,0	17,4	34,5
tmmin	1,4	2,0	7,0	4,4	9,9	13,8	19,5	18,9	11,2	10,1	7,2	2,9	9,*
tmin	-4,0	-3,8	2,4	-1,5	4,2	7,0	15,5	12,0	3,6	6,2	2,4	-4,5	-4,5
HRm	71	72	57	53	61	41	31	35	54	73	79	82	59

13.3 ESPECIES VEGETALES MUESTREADAS Y VIVEROS ESTUDIADOS

Los datos recogidos en las dos listas siguientes consisten en un resumen de los datos de las fichas de diagnostico de plantas ornamentales (de octubre 1991 a marzo 1995).

Tabla 13.3.1.-Viveros de los que se han tomado las muestras de plantas enfermas.

Vivero	Municipio	Nº de consultas
Puerta de Hierro	Madrid	30
Drago	Algete	3
Álvarez Estangüi	Aravaca	1
El Encín	Alcalá de Henares	10
Madrid 2000	Villanueva de la Cañada	9
O DOS	Madrid	3
San Martín	S. Martín de Valdeiglesias	3
La Veguilla	Boadilla del Monte	5
Cuevas	Alcalá de Henares	1
Jardín de Pelayo	Pelayos de la Presa	1
El Pinar	El Escorial	4
Raga	Madrid	1
Agropark	Madrid	1
Brunete	Brunete	1
L.Enseñat	Madrid	1
A.Estévez	Alcalá de Henares	5

OTRAS PROCEDENCIAS:
- Jardines públicos: 26 consultas
- Campos de golf: 2 consultas
- Jardines privados y particulares: 18 consultas

TOTAL CONSULTAS: 125

Tabla 13.3.2.-Géneros y especies vegetales afectados por hongos fitopatógenos de la Familia *Pythiaceae*.

-*Crataegus* sp.
-*Cupresocyparis leylandii*
-*Cupressus arizonica*
-*Cupressus macrocarpa*
-*Deutzia* sp.
-*Escallonia* sp.
-*Gypsophila* sp.
-*Hedera* sp.
-*Lavandula spica*
-*Ligustrum* sp.
-*Lupinus* sp.
-*Petunia hybrida*
-*Pinus pinea*
-*Pinus* sp.
-*Pyracantha coccinea*
-*Pyracantha crenato-serrata*
-*Rosmarinus officinalis*
-*Taxus* sp.
-*Thuja occidentalis*
-*Thuja orientalis*
-*Thymus* sp.

Tabla 13.3.3.-Otros géneros estudiados.

-Abies	*-Fagus*	*-Quercus*
-Acer	*-Gerbera*	*-Rosa*
-Aesculus	*-Magnolia*	*-Sequoia*
-Catalpa	*-Nerium*	*-Sophora*
-Cornus	*-Pelargonium*	*-Syringa*
-Cotoneaster	*-Picea*	*-Verbena*
-Dracaena	*-Populus*	*-Yucca*
-Euonimus	*-Prunus*	*-Zinnia*

En total hemos estudiado muestras de plantas enfermas pertenecientes a 41 géneros vegetales distintos.

13.4 TABLAS DE DATOS DE LOS ENSAYOS PREVIOS

Tabla 13.4.1.-Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad acumulada para los tres aislados patógenos aplicados a la misma concentración, para aquellos tiempos en que el ANOVA detectó diferencias significativas (p< 0,05). Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Tiempo(sdi)	1	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,004830	------		
	Duncan	0,059727	------		
	Scheffé	0,031215	------		
CM018	LSD	0,013233	0,510426	------	
	Duncan	0,013398	0,950049	------	
	Scheffé	0,076384	0,921482	------	
CL039	LSD	0,008193	0,723539	0,755441	------
	Duncan	0,039746	0,723697	0,755589	------
	Scheffé	0,050142	0,986490	0,990689	------

Tiempo(sdi)	2	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,001230	------		
	Duncan	0,016431	------		
	Scheffé	0,008832	------		
CM018	LSD	0,003425	0,461545	------	
	Duncan	0,003578	0,926478	------	
	Scheffé	0,022823	0,893942	------	
CL039	LSD	0,002233	0,658962	0,760740	------
	Duncan	0,011425	0,659128	0,760895	------
	Scheffé	0,015393	0,974368	0,991287	------

Tiempo(sdi)	3	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,000070	------		
	Duncan	0,000703	------		
	Scheffé	0,000569	------		
CM018	LSD	0,000325	0,174657	------	
	Duncan	0,000509	0,174831	------	
	Scheffé	0,002497	0,557531	------	
CL039	LSD	0,000025	0,293520	0,030946	------
	Duncan	0,000933	0,293667	0,138211	------
	Scheffé	0,000213	0,742879	0,156600	------

Tiempo(sdi)	4	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,000019	------		
	Duncan	0,000476	------		
	Scheffé	0,000162	------		
CM018	LSD	0,000149	0,056763	------	
	Duncan	0,000347	0,056922	------	
	Scheffé	0,001183	0,253765	------	
CL039	LSD	0,000007	0,258529	0,008810	------
	Duncan	0,000736	0,258684	0,042597	------
	Scheffé	0,000064	0,696893	0,053478	------

Tiempo(sdi)	5	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,000561	------		
	Duncan	0,003153	------		
	Scheffé	0,004204	------		
CM018	LSD	0,005795	0,111205	------	
	Duncan	0,005954	0,111354	------	
	Scheffé	0,036791	0,415214	------	
CL039	LSD	0,000179	0,336046	0,022715	------
	Duncan	0,002939	0,336215	0,104047	------
	Scheffé	0,001414	0,791042	0,121173	------

Tabla 13.4.2.-Efecto de la inoculación con los tres aislados patógenos aplicados a la misma concentración, incluyendo el control sano, sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	3944,9309	3	1314,9770	9,811937	0,004672
Error	1072,1446	8	134,01808		

Tabla 13.4.3.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones entre el control sano y los tres hongos inoculados a la misma concentración. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	AUDPC	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,002058	------		
	Duncan	0,010576	------		
	Scheffé	0,014276	------		
CM018	LSD	0,014788	0,203595	------	
	Duncan	0,014950	0,203755	------	
	Scheffé	0,084094	0,610901	------	
CL039	LSD	0,001207	0,691232	0,110158	------
	Duncan	0,016145	0,691391	0,409034	------
	Scheffé	0,008678	0,981084	0,412514	------

Tabla 13.4.4.-Efecto de la inoculación con los tres aislados patógenos aplicados a la misma concentración, incluyendo el control sano, sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en plantas de *Cupressus arizonica* Greene. Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	9,474809	3	3,158269	11,250173	0,003052
Error	2,245846	8	0,280731		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,481964	3	0,160654	1,433056	0,303348
Error	0,896850	8	0,112106		

Tabla 13.4.5.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable "longitud de raíz" para las comparaciones entre el control sano y los tres hongos inoculados a la misma concentración. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	Longitud de raíz	Control	CA013	CM018	CL039
CA013	LSD	0,031239	------		
	Duncan	0,031401	------		
	Scheffé	0,157811	------		
CM018	LSD	0,098149	0,002057	------	
	Duncan	0,098308	0,010569	------	
	Scheffé	0,380539	0,014268	------	
CL039	LSD	0,011774	0,541261	0,000909	------
	Duncan	0,046119	0,541439	0,012384	------
	Scheffé	0,069004	0,935953	0,006649	------

Tabla 13.4.6.-Efecto del hongo inoculado, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	555,3392	1	555,3392	6,657379	0,041759*
Concentración	206,0908	2	103,0454	1,235303	0,355394
Interacción	59,7806	2	29,8903	0,358323	0,712847
Dentro del grupo	500,5026	6	83,4171		

Tabla 13.4.7.-Efecto de las tres concentraciones de inóculo con los dos aislados patógenos estudiados, para el conjunto de los tratamientos incluyendo el control sano, sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	6757,1022	6	1126,1837	19,994085	0,000099
Error	506,9322	9	56,3258		

Tabla 13.4.8.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	AUDPCstd	CA013-3	CA013-7	CA013-11	CL039-3	CL039-7	CL039-11
Control	LSD	0,000038	0,000017	0,000023	0,001660	0,000123	0,000105
	Duncan	0,001666	0,002266	0,001860	0,001811	0,000979	0,001984
	Scheffé	0,001965	0,000941	0,001203	0,054605	0,005723	0,004949

Tabla 13.4.9.-Efecto del hongo, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	17,866319	1	17,866319	16,227289	0,006893*
Concentración	19,427784	2	9,713892	8,822753	0,016338*
Interacción	4,159074	2	2,079537	1,888763	0,231083
Dentro del grupo	6,606030	6	1,101005		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	8,346235	1	8,346235	21,028719	0,003748*
Inoculación	19,369452	2	9,684726	24,401106	0,001313*
Interacción	8,163162	2	4,081581	10,283728	0,011519*
Dentro del grupo	2,381382	6	0,396897		

Tabla 13.4.10.-Efecto de tres concentraciones de inóculo de los aislados patógenos CA013 y CL039 sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en plantas de *Cupressus arizonica* Greene. Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	80,472587	6	13,412097	7,170344	0,004913
Error	16,834461	9	1,870496		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	49,799507	6	8,299918	18,689257	0,000131
Error	3,996909	9	0,444101		

Tabla 13.4.11.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable "longitud de tallo" para tres concentraciones de inóculo. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	Longitud de tallo	Control	CA013-3	CA013-7	CA013-11	CL039-3	CL039-7
CA013-3	LSD	0,035142	------				
	Duncan	0,343626	------				
	Scheffé	0,468154	------				
CA013-7	LSD	0,021379	0,798770	------			
	Duncan	0,391674	0,798924	------			
	Scheffé	0,351318	0,999988	------			
CA013-11	LSD	0,000003	0,000083	0,000113	------		
	Duncan	0,001268	0,001699	0,000929	------		
	Scheffé	0,000167	0,004014	0,005284	------		
CL039-3	LSD	0,255290	0,302668	0,208177	0,000026	------	
	Duncan	0,255451	0,789841	0,911305	0,001998	------	
	Scheffé	0,949051	0,968608	0,918215	0,001356	------	
CL039-7	LSD	0,048491	0,868652	0,675377	0,000069	0,380025	------
	Duncan	0,208493	0,868778	0,990606	0,002497	0,380195	------
	Scheffé	0,553115	0,999999	0,999785	0,003369	0,986261	------
CL039-11	LSD	0,008304	0,461066	0,624115	0,000207	0,095323	0,371713
	Duncan	0,286503	0,927007	0,624289	0,000383	0,869017	0,990059
	Scheffé	0,187775	0,994637	0,999465	0,009130	0,739859	0,984943

Control = plantas sanas (sin inocular); CA013-i = plantas inoculadas con el aislado CA013 y con la concentración de inóculo "i"; CL039-i= plantas inoculadas con el aislado CL039 y con la concentración de inóculo "i"; tomando "i" los valores: 3 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 3.10^4 esp/ml., 7 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 7.10^4 esp/ml. ó 11 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 11.10^4 esp/ml.

Tabla 13.4.12.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable "longitud de raíz pricipal" para las tres concentraciones de inóculo ensayadas. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	Longitud de raíz	Conc3	Conc7	Conc11
Conc3	LSD	------		
	Duncan	------		
	Scheffé	------		
Conc7	LSD	0,106890	------	
	Duncan	0,107064	------	
	Scheffé	0,244791	------	
Conc11	LSD	0,005723	0,061179	------
	Duncan	0,027114	0,061348	------
	Scheffé	0,016452	0,150270	------

Conc3 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 3.10^4 esp/ml.; Conc7 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 7.10^4 esp/ml.; Conc11 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 11.10^4 esp/ml.

Tabla 13.4.13.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable "longitud de raíz principal" para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	Longitud de raíz	CA013-3	CA013-7	CA013-11	CL039-3	CL039-7	CL039-11
Control	LSD	0,016805	0,008809	0,000211	0,551565	0,029128	0,019601
	Duncan	0,327398	0,300041	0,016137	0,551737	0,132178	0,214104
	Scheffé	0,302249	0,195770	0,009282	0,998369	0,421711	0,333028

Tabla 13.4.14.-Efecto del hongo, de la concentración de inóculo y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (peso fresco de sistema radicular y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,000416	1	0,000416	9,562432	0,021325*
Concentración	0,000336	2	0,000168	3,862189	0,083556
Interacción	0,000474	2	0,000237	5,464658	0,044519*
Dentro del grupo	0,000258	6	0,000043		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de parte aérea

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,002155	1	0,002155	28,159676	0,001818*
Inoculación	0,000774	2	0,000774	10,115023	0,011969*
Interacción	0,000284	2	0,000284	3,711066	0,089328
Dentro del grupo	0,000076	6	0,000076		

Tabla 13.4.15.-Efecto de tres concentraciones de inóculo de los aislados patógenos CA013 y CL039 sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de sistema radicular y parte aérea) en plantas de *Cupressus arizonica* Greene. Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,001395	6	0,000232	2,069103	0,157106
Error	0,001012	9	0,000112		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,007827	6	0,001305	10,238365	0,001367
Error	0,001147	9	0,000127		

Tabla 13.4.16.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable "peso fresco de parte aérea" para las tres concentraciones de inóculo ensayadas. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	Peso fresco parte aérea	Conc3	Conc7	Conc11
Conc3	LSD	------		
	Duncan	------		
	Scheffé	------		
Conc7	LSD	0,768696	------	
	Duncan	0,768869	------	
	Scheffé	0,954109	------	
Conc11	LSD	0,009711	0,006803	------
	Duncan	0,009918	0,032014	------
	Scheffé	0,027288	0,019423	------

Conc3 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 3.10^4 esp/ml.; Conc7 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 7.10^4 esp/ml.; Conc11 = plantas inoculadas con la concentración de inóculo de 11.10^4 esp/ml.

Tabla 13.4.17.-Valores de "p" de la comparación de medias de la variable "peso fresco de parte aérea" para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable	Peso fresco de parte aérea	CA013-3	CA013-7	CA013-11	CL039-3	CL039-7	CL039-11
Control	LSD	0,001281	0,015359	0,000057	0,345552	0,052922	0,010283
	Duncan	0,056484	0,173769	0,005116	0,345727	0,224986	0,221210
	Scheffé	0,044133	0,285253	0,002840	0,980008	0,577053	0,218049

Tabla 13.4.18.-Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre el nivel de daños producidos por los patógenos en plántulas de *Cupressus arizonica* Greene. Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: Daños

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	1,013901	1	1,013901	6,050391	0,049136*
Concentración	1,027944	2	0,513972	3,067094	0,120899
Interacción	0,928000	2	0,460400	2,747410	0,142216
Dentro del grupo	1,005456	6	0,167576		

Tabla 13.4.19.-Efecto de las tres concentraciones de inóculo con los dos aislados patógenos estudiados, para el conjunto de los tratamientos incluyendo el control sano, sobre el nivel de daños producidos por los patógenos en plántulas de *Cupressus arizonica* Greene. Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: Daños

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	56,117905	6	9,352984	83,720054	0,000000*
Error	1,005456	9	0,111717		

13.5 TABLAS DE DATOS DE CAMPO

Tabla 13.5.1.-Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad entre tratamientos para la inoculación-1. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Tiempo (sdi)	P.irregulare-P.intermedium			P.irregulare-Control			P.intermedium-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1	0,266570	0,266752	0,512000	1,000000	1,000000	1,000000	0,266570	0,732581	0,512000
2	0,788299	0,788466	0,961591	0,501946	0,502139	0,782893	0,358170	0,845075	0,632455
3	0,409928	0,410136	0,691747	0,000497	0,002781	0,001520	0,001044	0,001258	0,003151
4	0,409928	0,410136	0,691747	0,000497	0,002781	0,001520	0,001044	0,001258	0,003151
5	0,321746	0,321932	0,587030	0,004542	0,004737	0,013171	0,001536	0,007704	0,004597
6	0,147552	0,147744	0,321034	0,064532	0,64705	0,157578	0,007781	0,036419	0,022088
7	0,088713	0,088883	0,208452	0,030988	0,031185	0,081054	0,002899	0,014099	0,008529
8	0,118307	0,118473	0,266868	0,037448	0,037636	0,096442	0,004177	0,020047	0,012147
9	0,125253	0,125415	0,280036	0,039295	0,039480	0,100776	0,004538	0,021703	0,013158
10	0,127343	0,127512	0,283958	0,052008	0,052185	0,129922	0,005770	0,027331	0,016583

Tabla 13.5.2.-Valores de "p" de las comparaciones de medias de mortalidad entre tratamientos para la inoculación-2. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Tiempo (sdi)	P.irregulare-P.intermedium			P.irregulare-Control			P.intermedium-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1	0,974467	0,974626	0,999444	0,734404	0,995587	0,939393	0,758303	0,758471	0,949869
2	0,583525	0,583692	0,849405	0,214668	0,214842	0,434006	0,096810	0,362190	0,224820
3	0,575412	0,575582	0,843369	0,363981	0,364168	0,639415	0,166513	0,545603	0,354462
4	0,996612	0,996717	0,999990	0,146440	0,146624	0,319033	0,145549	0,495748	0,317427
5	0,993058	0,993179	0,999959	0,130687	0,457774	0,290202	0,132336	0,132502	0,293265
6	0,996612	0,996717	0,999990	0,146440	0,146624	0,319033	0,145549	0,495748	0,317427
7	0,996612	0,996717	0,999990	0,146440	0,146624	0,319033	0,145549	0,495748	0,317427
8	0,996612	0,996717	0,999990	0,146440	0,146624	0,319033	0,145549	0,495748	0,317427
9	0,993058	0,993179	0,999959	0,130687	0,457774	0,290202	0,132336	0,132502	0,293265
10	0,993058	0,993179	0,999959	0,130687	0,457774	0,290202	0,132336	0,132502	0,293265

Tabla 13.5.3.-Valores de "p" de las comparaciones de medias de síntomas para la inoculación-1. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Tiempo (sdi)	P.irregulare-P.intermedium			P.irregulare-Control			P.intermedium-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1*	------	------	------	------	------	------	------	------	------
2**		0,24632			0,31732			0,12135	
3**		0,24632			0,31732			0,12135	
4**		0,24632			0,31732			0,12135	
5**		0,24632			0,31732			0,12135	
6	0,075070	0,075243	0,180131	0,065999	0,066171	0,160755	0,004597	0,021975	0,013324
7	0,132667	0,132833	0,293877	0,053746	0,053921	0,133820	0,006127	0,028950	0,017566
8	0,132667	0,132833	0,293877	0,053746	0,053921	0,133820	0,006127	0,028950	0,017566
9	0,132667	0,132833	0,293877	0,053746	0,053921	0,133820	0,006127	0,028950	0,017566
10	0,132667	0,132833	0,293877	0,053746	0,053921	0,133820	0,006127	0,028950	0,017566

*No hubo ninguna expresión de síntomas, todos los valores son cero. **Los valores transformados no cumplían las hipótesis previas por lo que se evaluaron mediante estadística no paramétrica a través del test U de Mann-Whitney.

Tabla 13.5.4.-Valores de "p" de las comparaciones de medias de síntomas para la inoculación-2. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi).

Tiempo (sdi)	P.irregulare-P.intermedium			P.irregulare-Control			P.intermedium-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1*		0,51269			0,12134			0,03691	
2*		0,99997			0,20424			0,20619	
3*		0,99997			0,20424			0,20619	
4*		0,99997			0,20424			0,20619	
5*		0,99997			0,20424			0,20619	
6	0,455695	0,455913	0,739291	0,101589	0,376454	0,234348	0,299839	0,300035	0,558164
7	0,455695	0,455913	0,739291	0,101589	0,376454	0,234348	0,299839	0,300035	0,558164
8	0,455695	0,455913	0,739291	0,101589	0,376454	0,234348	0,299839	0,300035	0,558164
9	0,455695	0,455913	0,739291	0,101589	0,376454	0,234348	0,299839	0,300035	0,558164
10	0,444499	0,444715	0,728072	0,104748	0,385735	0,240585	0,316933	0,317121	0,580790

*No cumplieron las hipótesis previas del ANOVA paramétrico por lo que se estudian según Mann-Whitney.

Tabla 13.5.5.-Valores de "p" para las comparaciones entre tratamientos de la variable "recuperación de patógeno" según el test U de Mann-Whitney

	Control	CA013.4[a]	CA013.5[a]	CA013.6[a]	CM018.4[a]	CM018.5[a]
Control	------					
CA013.4[a]	0,004114	------				
CA013.5[a]	0,037581	0,288852	------			
CA013.6[a]	0,317318	0,046403	0,258987	------		
CM018.4[a]	0,000141	0,457665	0,056761	0,003586	------	
CM018.5[a]	0,014311	0,382387	0,837198	0,155590	0,066321	------
CM018.6[a]	0,317318	0,046403	0,258987	1,000000	0,003586	0,155590

Tabla 13.5.6.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) Valores de la F del Análisis de Varianza.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	8,8076	1	8,8076	0,042373	0,837152
Inoculación	88,6692	2	44,3346	0,213291	0,808133
Interacción	1435,6026	2	717,8013	3,453298*	0,033839*
Dentro del grupo	35959,71	173	207,8596		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	76,7014	1	76,7014	3,194801	0,075613
Inoculación	331,6028	2	165,8014	6,906034*	0,001300*
Interacción	71,1862	2	35,5931	1,482538	0,229914
Dentro del grupo	4177,425	174	24,00819		

Tabla 13.5.7.- Valores de "p" para la comparación de la longitudes de tallo para el efecto principal (momento de inoculación). Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Efecto principal	Inoculación-1			Inoculación-2			Inoculación-3		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
Inoculación-1	-----	-----	-----	0,655332	0,654779	0,904920	0,003382	0,002966	0,013476
Inoculación-2	0,655332	0,654779	0,904920	-----	-----	-----	0,000784	0,003657	0,003497
Inoculación-3	0,003382	0,002966	0,013476	0,000784	0,003657	0,003497	-----	-----	-----

Tabla 13.5.8.-Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas del control para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,156929022
Coeficiente de determinación R^2	0,024626718
R^2 ajustado	-0,014388213
Error típico	0,349530799
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,077116372	0,077116372	0,631212645	0,43438854
Residuos	25	3,054294479	0,122171779		
Total	26	3,131410851			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	3,129146384	0,12403465	25,22800188	2,65696E-19
Variable X 1	0,020698413	0,026052488	0,794488921	0,43438854

Tabla 13.5.9.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-1 para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,27374327
Coeficiente de determinación R^2	0,074935378
R^2 ajustado	0,032886986
Error típico	0,775325631
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1,071286895	1,071286895	1,78212232	0,195540013
Residuos	22	13,22485636	0,601129834		
Total	23	14,29614325			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	2,965367965	0,348793963	8,501775498	2,11916E-08
Variable X 1	0,092207792	0,069071497	1,334961542	0,195540013

Tabla 13.5.10.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-1 para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,126038646
Coeficiente de determinación R^2	0,01588574
R^2 ajustado	-0,028846726
Error típico	0,398875939
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,056501541	0,056501541	0,355127755	0,557306703
Residuos	22	3,500244326	0,159102015		
Total	23	3,556745868			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	2,576298701	0,179441403	14,35732585	1,18165E-12
Variable X 1	0,021176046	0,035534693	0,595925965	0,557306703

Tabla 13.5.11.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-2 para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,298828287
Coeficiente de determinación R^2	0,089298345
R^2 ajustado	0,047902815
Error típico	0,594147588
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,761515315	0,761515315	2,157197785	0,156057851
Residuos	22	7,766249836	0,353011356		
Total	23	8,527765152			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	2,490692641	0,267287812	9,318392117	4,29202E-09
Variable X 1	0,077741703	0,052930874	1,468740203	0,156057851

Tabla 13.5.12.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-2 para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,273847529
Coeficiente de determinación R^2	0,074992469
R^2 ajustado	0,032946672
Error típico	0,303513905
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,164305556	0,164305556	1,783590146	0,195363035
Residuos	22	2,026655188	0,09212069		
Total	23	2,190960744			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	3,063636364	0,136541104	22,43746591	1,18903E-16
Variable X 1	0,036111111	0,027039168	1,335511193	0,195363035

Tabla 13.5.13.-Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-3 para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,583728992
Coeficiente de determinación R^2	0,340739536
R^2 ajustado	0,314369117
Error típico	0,303565262
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1,19072	1,19072	12,92127901	0,001391573
Residuos	25	2,303796704	0,092151868		
Total	26	3,494516704			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	2,842179894	0,1077233	26,38407753	9,01308E-20
Variable X 1	0,081333333	0,022626419	3,594618062	0,001391573

Tabla 13.5.14.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-3 para el período de otoño.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,399327239
Coeficiente de determinación R^2	0,159462244
R^2 ajustado	0,125840734
Error típico	0,401997038
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,766454467	0,766454467	4,742863797	0,03906314
Residuos	25	4,040040469	0,161601619		
Total	26	4,806494936			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	3,291259259	0,142652842	23,07180987	2,26933E-18
Variable X 1	0,065253968	0,02996309	2,177811699	0,03906314

Tabla 13.5.15.-Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas del control para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,850241591
Coeficiente de determinación R^2	0,722910762
R^2 ajustado	0,715421864
Error típico	1,15837271
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	129,5279199	129,5279199	96,53098915	7,40718E-12
Residuos	37	49,6476114	1,341827335		
Total	38	179,1755313			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,375953971	0,766391972	-0,490550508	0,626641136
Variable X 1	0,487063263	0,049573776	9,825018532	7,40718E-12

Tabla 13.5.16.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-1 para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,754949811
Coeficiente de determinación R^2	0,569949217
R^2 ajustado	0,558326222
Error típico	1,218762994
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	72,83777317	72,83777317	49,03635066	2,81225E-08
Residuos	37	54,9591797	1,485383235		
Total	38	127,7969529			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	1,494407259	0,80634684	1,853305781	0,071825977
Variable X 1	0,36524309	0,052158241	7,002595994	2,81225E-08

Tabla 13.5.17.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-1 para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,94877805
Coeficiente de determinación R^2	0,900179789
R^2 ajustado	0,897481945
Error típico	0,815138659
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	221,7049946	221,7049946	333,6664158	4,18847E-20
Residuos	37	24,58468821	0,664451033		
Total	38	246,2896828			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,883848189	0,539304594	-3,493106143	0,001255183
Variable X 1	0,637222962	0,034884714	18,26653815	4,18847E-20

Tabla 13.5.18.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-2 para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,803175249
Coeficiente de determinación R^2	0,645090481
R^2 ajustado	0,635498332
Error típico	1,020848387
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	70,08534297	70,08534297	67,25192334	7,60916E-10
Residuos	37	38,55886287	1,042131429		
Total	38	108,6442058			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	0,879247578	0,675404385	1,301809105	0,201028585
Variable X 1	0,35827564	0,043688278	8,200727001	7,60916E-10

Tabla 13.5.19.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-2 para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,954905775
Coeficiente de determinación R^2	0,911845039
R^2 ajustado	0,909462472
Error típico	0,879776149
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	296,2240893	296,2240893	382,7154588	4,17772E-21
Residuos	37	28,6382247	0,774006073		
Total	38	324,862314			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-3,094456284	0,58206946	-5,316300713	5,28987E-06
Variable X 1	0,736569727	0,037650943	19,56311475	4,17772E-21

Tabla 13.5.20.-Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-3 para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,970103201
Coeficiente de determinación R^2	0,941100221
R^2 ajustado	0,939508335
Error típico	0,65255165
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	251,7408624	251,7408624	591,1857157	2,36862E-24
Residuos	37	15,75547525	0,425823655		
Total	38	267,4963377			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-2,029209744	0,431735262	-4,700125107	3,54869E-05
Variable X 1	0,679016826	0,027926633	24,31431092	2,36862E-24

Tabla 13.5.21.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-3 para el período de primavera.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,876577768
Coeficiente de determinación R^2	0,768388584
R^2 ajustado	0,762128816
Error típico	1,086588644
Observaciones	39

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	144,9282304	144,9282304	122,7503293	2,61142E-13
Residuos	37	43,68497057	1,18067488		
Total	38	188,613201			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,144982227	0,718898853	-0,201672636	0,841277361
Variable X 1	0,515205124	0,046501701	11,07927477	2,61142E-13

Tabla 13.5.22.-Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas del control-1 en la inoculación-4.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,95
Coeficiente de determinación R^2	0,909484220
R^2 ajustado	0,905712729
Error típico	1,156272063
Observaciones	26

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	322,4053	322,4053	241,1471	0,000000
Residuos	24	32,0872	1,3370		
Total	25	354,4925			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	16,98156	0,447299	37,96467	0,000000
Variable X 1	1,02414	0,065951	15,52891	0,000000

Tabla 13.5.23.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-4.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,94
Coeficiente de determinación R^2	0,88839199
R^2 ajustado	0,88392767
Error típico	1,3138
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	343,4756	343,4756	198,9983	0,000000
Residuos	25	43,1506	1,7260		
Total	26	386,6261			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	15,91117	0,464115	34,28282	0,000000
Variable X 1	1,03663	0,073485	14,10667	0,000000

Tabla 13.5.24.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-4.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,98
Coeficiente de determinación R^2	0,95749656
R^2 ajustado	0,95579642
Error típico	0,76389
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	328,6399	328,6399	563,1877	0,000000
Residuos	25	14,5884	0,5835		
Total	26	343,2282			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	19,52125	0,255703	76,34344	0,000000
Variable X 1	1,08989	0,045926	23,73157	0,000000

Tabla 13.5.25.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas del control-2 en la inoculación-4.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,94
Coeficiente de determinación R^2	0,88111539
R^2 ajustado	0,87636001
Error típico	1,1988
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	266,2641	266,2641	185,2879	0,000000
Residuos	25	35,9257	1,4370		
Total	26	302,1898			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	19,07720	0,401269	47,54223	0,000000
Variable X 1	0,98102	0,072070	13,61205	0,000000

Tabla 13.5.26.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas del control en la inoculación-5.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,95
Coeficiente de determinación R^2	0,90559480
R^2 ajustado	0,90181860
Error típico	1,5438
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	571,5587	571,5587	239,8159	0,000000
Residuos	25	59,5831	2,3833		
Total	26	631,1417			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	22,13074	0,547834	40,39680	0,000000
Variable X 1	1,78194	0,115068	15,48599	0,000000

Tabla 13.5.27.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-5.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,95
Coeficiente de determinación R^2	0,90830771
R^2 ajustado	0,90464002
Error típico	1,3988
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	484,5873	484,5873	247,6510	0,000000
Residuos	25	48,9184	1,9567		
Total	26	533,5057			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	26,76911	0,496391	53,92752	0,000000
Variable X 1	1,64078	0,104263	15,73693	0,000000

Tabla 13.5.28.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-5.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,90
Coeficiente de determinación R^2	0,80560132
R^2 ajustado	0,79782537
Error típico	1,9819
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	406,9223	406,9223	103,6017	0,000000
Residuos	25	98,1939	3,9278		
Total	26	505,1162			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	24,34244	0,703283	34,61261	0,000000
Variable X 1	1,50356	0,147719	10,17849	0,000000

Tabla 13.5.29.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas del control en la inoculación-6.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,01
Coeficiente de determinación R^2	0,00012516
R^2 ajustado	----------
Error típico	8,7343
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,210	0,21009	0,002754	0,958622
Residuos	22	1678,327	76,28760		
Total	23	1678,327			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	56,48500	3,255073	17,35291	0,000000
Variable X 1	0,04083	0,778111	0,05248	0,958622

Tabla 13.5.30.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CA013 en la inoculación-6.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,00
Coeficiente de determinación R^2	0,00000546
R^2 ajustado	
Error típico	8,8578
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,009	0,00943	0,000120	0,991352
Residuos	22	1726,128	78,46036		
Total	23	1726,128			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	55,78028	3,301102	16,89747	0,000000
Variable X 1	-0,00865	0,789114	-0,01096	0,991352

Tabla 13.5.31.- Resúmen de la estadística de la regresión lineal para los datos de altura de plantas inoculadas con CM018 en la inoculación-6.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,09
Coeficiente de determinación R^2	0,00845316
R^2 ajustado	
Error típico	3,2697
Observaciones	24

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2,0052	2,00517	0,187555	0,669176
Residuos	22	235,2040	10,69109		
Total	23	237,2092			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	54,34389	1,218554	44,59703	0,000000
Variable X 1	0,12615	0,291290	0,43308	0,669176

13.6 TABLAS DE DATOS DE ENSAYOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Tabla 13.6.1.-Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad entre inoculaciones para el aislado CA013 de *P.irregulare*. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Primer ensayo.

Tiempo (sdi)	Inoc1-Inoc2			Inoc1-Control			Inoc2-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
0*		0,317318			1,000000			0,317318	
1*		1,000000			0,121345			0,121345	
2*		0,275242			0,036912			0,036912	
3*		0,126640			0,036912			0,036912	
4	0,000024	0,000234	0,000202	0,000000	0,000401	0,000004	0,000007	0,000415	0,000060
5	0,016914	0,017094	0,094375	0,000012	0,000433	0,000102	0,000015	0,000130	0,000461
6	0,000019	0,000231	0,000158	0,000000	0,000401	0,000000	0,000000	0,000401	0,000000

*Valores de "p" conseguidos por la aplicación de la estadística no paramétrica (Mann-Whitney).

Tabla 13.6.2.-Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad entre inoculaciones para el aislado CL039 de *P.paroecandrum*. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Primer ensayo.

Tiempo (sdi)	Inoc1-Inoc2			Inoc1-Control			Inoc2-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
0*		0,317318			1,000000			0,317318	
1	0,675264	0,675431	0,977936	0,003572	0,045035	0,023722	0,012542	0,012710	0,072908
2	0,010245	0,010406	0,061088	0,000041	0,001140	0,000339	0,011353	0,011510	0,066842
3*		0,046310			0,036912			0,046310	
4	0,395660	0,395854	0,846422	0,000016	0,000824	0,000135	0,000457	0,000635	0,003463
5	0,685725	0,685886	0,980036	0,000010	0,000425	0,000085	0,000039	0,000557	0,000318
6	0,085708	0,085860	0,345353	0,000002	0,000403	0,000018	0,000002	0,000402	0,000014

*Valores de "p" conseguidos por la aplicación de la estadística no paramétrica (Mann-Whitney).

Tabla 13.6.3.- Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad entre las inoculaciones para el aislado CA013 de *P.irregulare* y el control. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Segundo ensayo.

Tiempo (sdi)	Inoc1-Inoc2			Inoc1-Control			Inoc2-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1*		0,021032			0,007401			0,317318	
2*		0,002804			0,002095			0,317318	
3*		0,024673			0,003950			0,395000	
4*		0,003888			0,003702			0,406435	
5	0,000000	0,000149	0,000000	0,000000	0,000498	0,000000	0,003308	0,018038	0,057860
6	0,037241	0,037366	0,331238	0,000000	0,000498	0,000000	0,000000	0,000264	0,000000

*Valores de "p" conseguidos por la aplicación de la estadística no paramétrica (Mann-Whitney).

Tabla 13.6.4.-Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad entre las inoculaciones para el aislado CL039 de *P.paroecandrum* y el control. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Segundo ensayo.

Tiempo (sdi)	Inoc1-Inoc2			Inoc1-Control			Inoc2-Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1*		0,139659			0,139659			1,000000	
2*		0,022236			0,022236			1,000000	
3*		0,006396			0,003888			0,395073	
4*		0,003950			0,003702			0,015573	
5	0,000000	0,000498	0,000000	0,000000	0,000519	0,000000	0,031001	0,031126	0,294712
6	0,000008	0,000599	0,000308	0,000000	0,000519	0,000000	0,000004	0,000151	0,000160

*Valores de "p" conseguidos por la aplicación de la estadística no paramétrica (Mann-Whitney).

Tabla 13.6.5.-Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad entre las inoculaciones con ambos aislados. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Segundo ensayo.

Tiempo (sdi)	CA013.1ª-CL039.1ª			CA013.2ª-CL039.1ª		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1*		0,067795			0,528341	
2*		0,046574			0,074172	
3*		0,630359			0,077658	
4*		0,688407			0,003888	
5	0,729936	0,730064	0,998087	0,000000	0,000264	0,000000
6	0,720661	0,720785	0,997804	0,016818	0,084238	0,195261

*Valores de "p" conseguidos por la aplicación de la estadística no paramétrica (Mann-Whitney).

Tiempo (sdi)	CA013.1ª-CL039.2ª			CA013.2ª-CL039.2ª		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
1*		0,007401			0,317318	
2*		0,002095			0,317318	
3*		0,003950			0,373814	
4*		0,003950			0,199407	
5	0,000000	0,000264	0,000000	0,345580	0,345730	0,918308
6	0,000020	0,000360	0,000719	0,005522	0,005682	0,086196

*Valores de "p" conseguidos por la aplicación de la estadística no paramétrica (Mann-Whitney).

Tabla 13.6.6.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) transformada. Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,014662	1	0,014662	1,4357	0,244843
Inoculación	2,275264	1	2,275264	222,7926	0,000000*
Interacción	0,050241	1	0,050241	4,9195	0,038295*
Dentro del grupo	0,20424	20	0,010212		

Tabla 13.6.7.-Valores de "p" para las comparaciones entre tratamientos de la variable "recuperación de patógeno" según el test U de Mann-Whitney

	Control	CA013.1[a]	CA013.2[a]	CL039.1[a]
Control	------			
CA013.1[a]	0,009379	------		
CA013.2[a]	0,004681	0,317318	------	
CL039.1[a]	0,014311	0,414222	1,000000	------
CL039.2[a]	0,009379	1,000000	0,317318	0,414222

Tabla 13.6.8.-Efecto del hongo, de la inoculación y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo transformadas). Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,4010	1	0,4010	5,8553	0,026334*
Inoculación	7,2152	1	7,2152	105,3597	0,000000*
Interacción	0,1182	1	0,1182	1,7261	0,205406
Dentro del grupo	1,2326	18	0,06848		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,0030	1	0,0030	0,18495	0,672257
Inoculación	0,1948	1	0,1948	12,12007	0,002665*
Interacción	0,0449	1	0,0449	2,79349	0,111942
Dentro del grupo	0,2898	18	0,0161		

13.7 AJUSTE A MODELOS NO LINEALES LINEALIZABLES

Resultados de los ajustes por regresión lineal a las formas linearizadas de los modelos exponencial, monomolecular, logístico y Gompertz de las curvas de incidencia de enfermedad originadas por la inoculación en semillero de los aislados CA013 y CL039 en dos momentos según edad de la planta. Para elegir el mejor modelo se consideró el coeficiente de determinación calculado (R^2c), el cuadrado medio del error de la regresión (MSE) y la distribución de los residuos.

Tabla 13.7.1.-Ajuste de los datos de incidencia de enfermedad (mortalidad acumulada en función del tiempo) de las inoculaciones 1 y 2 con CA013 y CL039 a las formas linealizadas de los modelos Exponencial, Monomolecular, Logístico y Gompertz. Se marca con subrayado el mejor ajuste.

Hongo	Inoculación	Modelo	R^2	R^2c	MSE	F	p
CA013	1	Exponencial	13,4	15,9	0,7757	0,7801	0,4175
		Monomolecular	95,8	96,3	1,1826	113,66	0,0001
		Logístico	40,6	59,6	3,8738	3,4230	0,1235
		Gompertz	64,5	85,4	1,9459	9,0645	0,0297
CA013	2	Exponencial	90,5	2,5	8,3247	47,793	0,0010
		Monomolecular	92,1	93,9	0,3739	58,023	0,0006
		Logístico	94,2	29,5	12,227	81,658	0,0003
		Gompertz	97,5	49,6	2,4711	193,24	0,0000
CL039	1	Exponencial	67,3	0,9	0,9054	4,1158	0,1797
		Monomolecular	89,6	92,3	1,1855	25,957	0,0146
		Logístico	72,9	39,3	2,8647	5,3911	0,1459
		Gompertz	76,0	71,3	1,2942	6,3501	0,1279
CL039	2	Exponencial	75,1	4,4	9,3906	9,0655	0,0572
		Monomolecular	86,9	91,1	0,4815	19,924	0,0209
		Logístico	82,9	24,8	14,125	14,593	0,0316
		Gompertz	92,8	43,9	2,7386	38,883	0,0083

Tabla 13.7.2.-Valores del coeficiente de Durbin-Watson para estudiar la autocorrelación de residuos en el modelo monomolecular. El valor marcado con asterisco "*" indica correlación positiva.

	Modelo monomolecular		
	Inoculación-1	Inoculación-2	Control
P.irregulare	2,139581	1,305071*	1,789282
P.paroecandrum	1,579407	1,858856	2,175248

Tabla 13.7.3.- Valores de R^2 calculados para el aislado CA013 (ajuste de los valores de "y" predichos por el modelo y los valores reales de "y" obtenidos en el ensayo).

MODELO EXPONENCIAL			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	1,0000	0,0170	1,0000
0,0567	0,2638	0,0440	0,0478
0,1927	0,3116	0,1617	0,0824
0,3513	0,3680	0,1617	0,1421
0,5813	0,4347	0,2733	0,2452
0,6133	0,5134	0,4380	0,4229
0,6687	0,6064	0,5003	0,7296

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,399078907	0,158704725
Coeficiente de determinación R^2	0,159263974	0,02518719
R^2 ajustado	-0,00888323	-0,16977537
Error típico	0,183324324	0,390501375
Observaciones	7	7

MODELO MONOMOLECULAR			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	0,0000	0,0170	0,0000
0,0567	0,1021	0,0440	0,0537
0,1927	0,2689	0,1617	0,1570
0,3513	0,4047	0,1617	0,2490
0,5813	0,5153	0,2733	0,3309
0,6133	0,6053	0,4380	0,4039
0,6687	0,6786	0,5003	0,4690

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,981214164	0,968780627
Coeficiente de determinación R^2	0,962781235	0,938535904
R^2 ajustado	0,955337482	0,926243085
Error típico	0,054335806	0,047922017
Observaciones	7	7

Tabla 13.7.3. (cont.).- Valores de R^2 calculados para el aislado CA013 (ajuste de los valores de "y" predichos por el modelo y los valores reales de "y" obtenidos en el ensayo).

MODELO LOGISTICO			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	0,5000	0,0170	0,5000
0,0567	0,2271	0,0440	0,0480
0,1927	0,2988	0,1617	0,0890
0,3513	0,3820	0,1617	0,1591
0,5813	0,4728	0,2733	0,2682
0,6133	0,5654	0,4380	0,4150
0,6687	0,6536	0,5003	0,5788

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,772190555	0,543511641
Coeficiente de determinación R^2	0,596278253	0,295404904
R^2 ajustado	0,515533903	0,154485885
Error típico	0,081369111	0,191244832
Observaciones	7	7

MODELO GOMPERTZ			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	0,3679	0,0170	0,3679
0,0567	0,2130	0,0440	0,0517
0,1927	0,3048	0,1617	0,1106
0,3513	0,4014	0,1617	0,1948
0,5813	0,4960	0,2733	0,2966
0,6133	0,5835	0,4380	0,4054
0,6687	0,6611	0,5003	0,5112

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,924112055	0,704365462
Coeficiente de determinación R^2	0,85398309	0,496130704
R^2 ajustado	0,824779708	0,395356844
Error típico	0,061340842	0,129027573
Observaciones	7	7

Tabla 13.7.4.-Valores de R^2 calculados para el aislado CL039 (ajuste de los valores de "y" predichos por el modelo y los valores reales de "y" obtenidos en el ensayo).

MODELO EXPONENCIAL			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	1,0000	0,0070	1,0000
0,1770	0,2545	0,1683	0,0559
0,6337	0,3895	0,2787	0,1474
0,6700	0,5962	0,3373	0,3885
0,7177	0,9124	0,6287	1,0239

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,0944855	0,209960217
Coeficiente de determinación R^2	0,00892751	0,044083293
R^2 ajustado	-0,32142999	-0,27455561
Error típico	0,370965779	0,522184437
Observaciones	5	5

MODELO MONOMOLECULAR			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	0,0000	0,0070	0,0000
0,1770	0,3094	0,1683	0,1518
0,6337	0,5105	0,2787	0,3189
0,6700	0,6531	0,3373	0,4531
0,7177	0,7542	0,6287	0,5608

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,960642511	0,95419834
Coeficiente de determinación R^2	0,922834033	0,910494471
R^2 ajustado	0,897112044	0,880659295
Error típico	0,096177261	0,077970162
Observaciones	5	5

Tabla 13.7.4. (cont.).- Valores de R^2 calculados para el aislado CL039 (ajuste de los valores de "y" predichos por el modelo y los valores reales de "y" obtenidos en el ensayo).

MODELO LOGISTICO			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	0,5000	0,0070	0,5000
0,1770	0,2744	0,1683	0,0619
0,6337	0,4464	0,2787	0,1779
0,6700	0,6322	0,3373	0,4153
0,7177	0,7856	0,6287	0,6998

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,626798962	0,497986176
Coeficiente de determinación R^2	0,392876939	0,247990231
R^2 ajustado	0,190502586	-0,00267969
Error típico	0,173620742	0,255088899
Observaciones	5	5

MODELO GOMPERTZ			
Inoculación-1		Inoculación-2	
Actual(y)	Predicho (y1)	Actual(y)	Predicho (y1)
0,0000	0,3679	0,0070	0,3679
0,1770	0,2950	0,1683	0,0916
0,6337	0,4800	0,2787	0,2426
0,6700	0,6432	0,3373	0,4321
0,7177	0,7669	0,6287	0,6082

Estadísticas de la regresión		
	Inoculación-1	Inoculación-2
Coeficiente de correlación múltiple	0,844181691	0,662560457
Coeficiente de determinación R^2	0,712642727	0,438986359
R^2 ajustado	0,616856969	0,251981813
Error típico	0,120300693	0,168590515
Observaciones	5	5

Tabla 13.7.5.-Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CA013 en inoculación-1.

MODELO EXPONENCIAL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,3673810
Coeficiente de determinación R^2	0,134968
R^2 ajustado	-0,038037
Error típico	0,997144
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,775689	0,775689	0,780138	0,417537
Residuos	5	4,971487	0,994297		
Total	6	5,747177			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,498918	0,679431	-2,206110	0,078487
Variable X 1	0,023777	0,026926	0,883254	0,417537

MODELO MONOMOLECULARL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,978704
Coeficiente de determinación R^2	0,957862
R^2 ajustado	0,949434
Error típico	0,102002
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1,182556	1,182556	113,659070	0,000125
Residuos	5	0,052022	0,010404		
Total	6	1,234578			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,097858	0,069502	-1,407974	0,218169
Variable X 1	0,029358	0,002753	10,661100	0,000125

Tabla 13.7.5 (cont.).- Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CA013 en inoculación-1.

MODELO LOGÍSTICO	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,637487
Coeficiente de determinación R^2	0,406390
R^2 ajustado	0,287668
Error típico	1,063802
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	3,87376	3,87376	3,42303	0,12353
Residuos	5	5,65837	1,13167		
Total	6	9,53213			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,596776	0,724859	-2,202880	0,078808
Variable X 1	0,053136	0,028720	1,850144	0,123526

MODELO GOMPERTZ	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,802804
Coeficiente de determinación R^2	0,644494
R^2 ajustado	0,573393
Error típico	0,463326
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1,945877	1,945877	9,064461	0,029731
Residuos	5	1,073355	0,214671		
Total	6	3,019232			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,69955	0,31570	-2,21583	0,07753
Variable X 1	0,03766	0,01251	3,01072	0,02973

Tabla 13.7.6.-Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CA013 en inoculación-2.

MODELO EXPONENCIAL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,951468
Coeficiente de determinación R^2	0,905291
R^2 ajustado	0,886349
Error típico	0,417353
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	8,324765	8,324765	47,793113	0,000971
Residuos	5	0,870917	0,174183		
Total	6	9,195682			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-3,586882	0,284378	-12,613078	0,000056
Variable X 1	0,077895	0,011267	6,913256	0,000971

MODELO MONOMOLECULARL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,959512
Coeficiente de determinación R^2	0,920664
R^2 ajustado	0,904796
Error típico	0,080271
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,373865	0,373865	58,022887	0,000620
Residuos	5	0,032217	0,006443		
Total	6	0,406082			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,060346	0,054695	-1,103307	0,320143
Variable X 1	0,016507	0,002167	7,617276	0,000620

Tabla 13.7.6 (cont.).- Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CA013 en inoculación-2.

MODELO LOGÍSTICO	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,970723
Coeficiente de determinación R^2	0,942302
R^2 ajustado	0,930763
Error típico	0,386954
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	12,226996	12,226996	81,658476	0,000277
Residuos	5	0,748667	0,149733		
Total	6	12,975662			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-3,647228	0,263665	-13,832828	0,000035
Variable X 1	0,094402	0,010447	9,036508	0,000277

MODELO GOMPERTZ	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,987308
Coeficiente de determinación R^2	0,974778
R^2 ajustado	0,969734
Error típico	0,113082
Observaciones	7

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2,471067	2,471067	193,239614	0,000035
Residuos	5	0,063938	0,012788		
Total	6	2,535005			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,383326	0,077053	-17,953029	0,000010
Variable X 1	0,042439	0,003053	13,901065	0,000035

Tabla 13.7.7.-Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CL039 en inoculación-1.

MODELO EXPONENCIAL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,820351
Coeficiente de determinación R^2	0,672975
R^2 ajustado	0,509463
Error típico	0,469022
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,905388	0,905388	4,115749	0,179649
Residuos	2	0,439963	0,219981		
Total	3	1,345351			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,793847	0,574432	-3,122819	0,089058
Variable X 1	0,060790	0,029965	2,028731	0,179649

MODELO MONOMOLECULARL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,946784
Coeficiente de determinación R^2	0,896400
R^2 ajustado	0,861867
Error típico	0,213713
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1,185561	1,185561	25,957563	0,014618
Residuos	3	0,137019	0,045673		
Total	4	1,322580			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	0,025829	0,165541	0,156025	0,885921
Variable X 1	0,049189	0,009655	5,094856	0,014618

Tabla 13.7.7 (cont.).- Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CL039 en inoculación-1.

MODELO LOGÍSTICO	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,854052
Coeficiente de determinación R^2	0,729404
R^2 ajustado	0,594107
Error típico	0,728964
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2,864772	2,864772	5,391104	0,145948
Residuos	2	1,062778	0,531389		
Total	3	3,927550			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,729275	0,892795	-1,936923	0,192365
Variable X 1	0,108134	0,046572	2,321875	0,145948

MODELO GOMPERTZ	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,872056
Coeficiente de determinación R^2	0,760482
R^2 ajustado	0,640722
Error típico	0,451449
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	1,294190	1,294190	6,350090	0,127944
Residuos	2	0,407613	0,203806		
Total	3	1,701802			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,708359	0,552910	-1,281147	0,328620
Variable X 1	0,072680	0,028842	2,519939	0,127944

Tabla 13.7.8.-Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CL039 en inoculación-2.

MODELO EXPONENCIAL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,866809
Coeficiente de determinación R^2	0,751358
R^2 ajustado	0,668477
Error típico	1,017771
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	9,390594	9,390594	9,065524	0,057171
Residuos	3	3,107573	1,035858		
Total	4	12,498167			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-3,852548	0,788362	-4,886775	0,016388
Variable X 1	0,138436	0,045978	3,010901	0,057171

MODELO MONOMOLECULARL	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,932273
Coeficiente de determinación R^2	0,869134
R^2 ajustado	0,825511
Error típico	0,155464
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	0,481548	0,481548	19,924136	0,020942
Residuos	3	0,072507	0,024169		
Total	4	0,554055			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-0,054856	0,120422	-0,455532	0,679676
Variable X 1	0,031349	0,007023	4,463646	0,020942

Tabla 13.7.8 (cont.).- Resumen de la estadística de la regresión para los valores linealizados de los modelos no lineales. Aislado CL039 en inoculación-2.

MODELO LOGÍSTICO	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,910757
Coeficiente de determinación R^2	0,829478
R^2 ajustado	0,772637
Error típico	0,983839
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	14,125152	14,125152	14,593011	0,031572
Residuos	3	2,903818	0,967939		
Total	4	17,028970			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-3,907404	0,762079	-5,127298	0,014365
Variable X 1	0,169785	0,044445	3,820080	0,031572

MODELO GOMPERTZ	
Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,963520
Coeficiente de determinación R^2	0,928372
R^2 ajustado	0,904495
Error típico	0,265389
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	*Suma de cuadrados*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Valor crítico de F*
Regresión	1	2,738566	2,738566	38,882771	0,008318
Residuos	3	0,211294	0,070431		
Total	4	2,949860			

	Coeficientes	*Error típico*	*Estadístico t*	*Probabilidad*
Intercepción	-1,394644	0,205569	-6,784297	0,006546
Variable X 1	0,074759	0,011989	6,235605	0,008318

13.8 TABLAS DE DATOS DE LOS ENSAYOS DE ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED

Tabla 13.8.1.-Valores de "p" para las comparaciones entre tratamientos de la variable "longitud de tallo" en el primer ensayo con *Petunia hybrida* según el test U de Mann-Whitney .

	Control 1	CA013	CM018	CL039
Control 1	------			
CA013	0,0495	------		
CM018	0,0495	0,0495	------	
CL039	------	0,827	0,513	------
Control 2	0,0495	------	------	0,513

Control1=testigo expuesto a las condiciones ambientales de CA013 y CM018; Control2= testigo expuesto a las condiciones de CL039.

Tabla 13.8.2.-Efecto del hongo inoculado sobre el parámetro de crecimiento "longitud de raíz más desarrollada" en plantas de *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Primer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	43,6870	4	10,9217	11,45459	0,00094
Error	9,5348	10	0,9535		

Tabla 13.8.3.- Valores de "p" para la comparación entre tratamientos de la longitudes de raíz para el primer ensayo con *Petunia hybrida*. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Tratamiento	CA013			CM018			Control 1		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,945821	0,945922	0,999996	0,001803	0,002399	0,025665
CM018	0,945821	0,945922	0,999996	-----	-----	-----	0,002015	0,002163	0,028274
Control 1	0,001803	0,002399	0,025665	0,002015	0,002163	0,028274	-----	-----	-----

Tratamiento	CL039			Control 2		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CL039	-----	-----	-----	0,510194	0,510374	0,973588
Control 2	0,510194	0,510374	0,973588	-----	-----	-----

Control1=testigo expuesto a las condiciones ambientales de CA013 y CM018; Control2= testigo expuesto a las condiciones de CL039.

Tabla 13.8.4.-Efecto del hongo inoculado sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz más desarrollada y tallo) en plantas de *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	81,7714	2	40,8857	4,54887	0,03936
Error	89,8810	10	8,9881		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	1,7951	2	0,8975	0,22876	0,79957
Error	39,2357	10	3,9236		

Tabla 13.8.5.- Valores de "p" para la comparación entre tratamientos de las longitudes de raíz para el segundo ensayo con *Petunia hybrida*. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Longitud de raíz	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,495313	0,495491	0,783229	0,014758	0,071006	0,044321
CL039	0,495313	0,495491	0,783229	-----	-----	-----	0,060145	0,060299	0,15659
Control	0,014758	0,071006	0,044321	0,060145	0,060299	0,15659	-----	-----	-----

Tabla 13.8.6.-Efecto del hongo inoculado sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) en plantas de *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,2030	2	0,1015	1,75126	0,22281
Error	0,5795	10	0,0579		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	2,6467	2	1,3234	0,85191	0,45537
Error	15,5339	10	1,5534		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso seco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,0057	2	0,0029	1,07577	0,37744
Error	0,0265	10	0,0027		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso seco de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,1344	2	0,0672	2,77929	0,10969
Error	0,2418	10	0,0242		

Tabla 13.8.7.- Valores de "p" para la comparación entre tratamientos de las longitudes de raíz y tallo y pesos frescos y secos de raíz y parte aérea para el segundo ensayo con *Petunia hybrida*. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Longitud de raíz	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,495313	0,495491	0,783229	0,014758	0,071006	0,044321
CL039	0,495313	0,495491	0,783229	-----	-----	-----	0,060145	0,060299	0,15659
Control	0,014758	0,071006	0,044321	0,060145	0,060299	0,15659	-----	-----	-----

Longitud de tallo	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,555744	0,966997	0,833252	0,605324	0,605489	0,869065
CL039	0,555744	0,966997	0,833252	-----	-----	-----	0,943913	0,944018	0,997401
Control	0,605324	0,605489	0,869065	0,943913	0,944018	0,997401	-----	-----	-----

Peso fresco de raíz	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,091848	0,358829	0,225005	0,352808	0,352971	0,635349
CL039	0,091848	0,358829	0,225005	-----	-----	-----	0,418256	0,418434	0,708737
Control	0,352808	0,352971	0,635349	0,418256	0,418434	0,708737	-----	-----	-----

Peso fresco de parte aérea	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,829166	0,829300	0,975827	0,316725	0,316852	0,590595
CL039	0,829166	0,829300	0,975827	-----	-----	-----	0,316725	0,316852	0,590595
Control	0,316725	0,316852	0,590595	0,254123	0,723692	0,505037	-----	-----	-----

Peso seco de raíz	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,533275	0,540701	0,815486	0,173162	0,199047	0,377445
CL039	0,533275	0,540701	0,815486	-----	-----	-----	0,453815	0,438781	0,744654
Control	0,173162	0,199047	0,377445	0,453815	0,438781	0,744654	-----	-----	-----

Peso seco de parte aérea	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,70957	0,554897	0,929695	0,08469	0,089806	0,210111
CL039	0,70957	0,554897	0,929695	-----	-----	-----	0,054340	0,056370	0,143335
Control	0,08469	0,089806	0,210111	0,054340	0,056370	0,143335	-----	-----	-----

Tabla 13.8.8.-Efecto del hongo inoculado sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz más desarrollada y tallo) en plantas de *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	47,4162	2	23,7081	7,04813	0,00845
Error	43,7287	13	3,3637		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	7,3667	2	3,6834	2,78298	0,09862
Error	17,2060	13	1,3235		

Tabla 13.8.9.- Valores de "p" para la comparación entre tratamientos de las longitudes de raíz para el tercer ensayo con *Petunia hybrida*. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Longitud de raíz	CA013			CL039			Control		
	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé	LSD	Duncan	Scheffé
CA013	-----	-----	-----	0,494428	0,526622	0,784623	0,01055	0,008800	0,033647
CL039	0,494428	0,526622	0,784623	-----	-----	-----	0,003151	0,003321	0,010898
Control	0,01055	0,008800	0,033647	0,003151	0,003321	0,010898	-----	-----	-----

Tabla 13.8.10.-Efecto del hongo inoculado sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos y secos) en plantas de *Petunia hybrida*. Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,0000	2	0,0000	0,01551	0,98463
Error	0,0185	13	0,0014		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,1184	2	0,0592	0,63931	0,54347
Error	1,2038	13	0,0926		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso seco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,0003	2	0,0001	3,01835	0,08381
Error	0,0006	13	0,0000		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso seco de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,0012	2	0,0006	0,69689	0,51581
Error	0,0116	13	0,0009		

13.9 TABLAS DE DATOS DE LOS ENSAYOS DE CONTROL

Tabla 13.9.1.-Primer ensayo. Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación con el aislado CA013 de *P.irregulare* sobre plantas de semillero de *Cupressus arizonica* Greene. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). CA013 = plantas inoculadas con CA013 (incluye las dos concentraciones ensayadas) y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tiempo (sdi):	1	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,00011	------				
	Duncan	0,00025	------				
	Scheffé	0,00808	------				
A(0)	LSD	0,00002	0,36797	------			
	Duncan	0,00008	0,36817	------			
	Scheffé	0,00193	0,98729	------			
A(1)	LSD	0,72859	0,00006	0,00001	------		
	Duncan	0,72873	0,00016	0,00006	------		
	Scheffé	0,99994	0,00467	0,00113	------		
A(2)	LSD	0,00948	0,03709	0,00600	0,00469	------	
	Duncan	0,01417	0,03722	0,00785	0,00816	------	
	Scheffé	0,24738	0,53128	0,18346	0,15513	------	
A(3)	LSD	0,02641	0,01347	0,00213	0,01323	0,60951	------
	Duncan	0,03269	0,01711	0,00342	0,01939	0,60967	------
	Scheffé	0,44845	0,30715	0,08792	0,30387	0,99946	------
A(4)	LSD	0,06378	0,00532	0,00085	0,03289	0,33860	0,64675
	Duncan	0,06391	0,00819	0,00162	0,04032	0,36318	0,64691
	Scheffé	0,67199	0,16911	0,04351	0,50123	0,98249	0,99971

Tiempo (sdi):	2	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,00005	------				
	Duncan	0,00015	------				
	Scheffé	0,00427	------				
A(0)	LSD	0,00000	0,03865	------			
	Duncan	0,00003	0,03877	------			
	Scheffé	0,00015	0,54168	------			
A(1)	LSD	0,08888	0,00163	0,00002	------		
	Duncan	0,08903	0,00301	0,00008	------		
	Scheffé	0,75719	0,07210	0,00213	------		
A(2)	LSD	0,05424	0,00279	0,00004	0,78913	------	
	Duncan	0,07658	0,00294	0,00014	0,80566	------	
	Scheffé	0,62953	0,10752	0,00323	0,99999	------	
A(3)	LSD	0,06052	0,00249	0,00003	0,83431	0,95339	------
	Duncan	0,07946	0,00335	0,00012	0,84315	0,95493	------
	Scheffé	0,65828	0,09866	0,00295	0,99999	1,00000	------
A(4)	LSD	0,07880	0,00186	0,00003	0,94704	0,84053	0,88639
	Duncan	0,09255	0,00302	0,00009	0,94714	0,84908	0,88652
	Scheffé	0,72679	0,07971	0,00236	1,00000	0,99999	0,99999

Tiempo (sdi):	3	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	Mann-W	------					
A(-1)	Mann-W	0,02093	------				
A(0)	Mann-W	0,24822	0,46783	------			
A(1)	Mann-W	0,02093	0,2482	0,24822	------		
A(2)	Mann-W	0,04331	0,08327	0,24822	0,38648	------	
A(3)	Mann-W	0,24822	0,02093	0,24822	0,02093	0,14892	------
A(4)	Mann-W	0,05332	0,14892	0,24822	0,77283	0,38648	0,14892

Tiempo (sdi):	4	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	Mann-W	------					
A(-1)	Mann-W	0,02093	------				
A(0)	Mann-W	0,24822	0,77283	------			
A(1)	Mann-W	0,02092	0,14892	0,38648	------		
A(2)	Mann-W	0,04332	0,14892	0,24822	1,00000	------	
A(3)	Mann-W	0,19127	0,02941	0,24822	0,38648	0,24822	------
A(4)	Mann-W	0,02092	0,24822	0,24822	1,00000	0,77283	0,14893

Tiempo (sdi):	5	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,00939	------				
	Duncan	0,01768	------				
	Scheffé	0,24578	------				
A(0)	LSD	0,02624	0,60828	------			
	Duncan	0,04216	0,60843	------			
	Scheffé	0,44694	0,99945	------			
A(1)	LSD	0,11423	0,20665	0,43713	------		
	Duncan	0,14806	0,22908	0,43730	------		
	Scheffé	0,81735	0,93075	0,99425	------		
A(2)	LSD	0,28989	0,07700	0,18788	0,56814	------	
	Duncan	0,31422	0,10455	0,22172	0,58836	------	
	Scheffé	0,97064	0,72088	0,91602	0,99898	------	
A(3)	LSD	0,46889	0,03996	0,10378	0,36312	0,72751	------
	Duncan	0,46907	0,06114	0,13609	0,40029	0,72765	------
	Scheffé	0,99609	0,55020	0,79497	0,98659	0,99994	------
A(4)	LSD	0,15150	0,15797	0,34976	0,86938	0,68294	0,45261
	Duncan	0,18268	0,18969	0,37433	0,86951	0,68307	0,47597
	Scheffé	0,87746	0,88549	0,98448	0,99999	0,99985	0,99523

Tiempo (sdi):	6	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	Mann-W	------					
A(-1)	Mann-W	0,02093	------				
A(0)	Mann-W	0,24822	0,56371	------			
A(1)	Mann-W	0,02093	0,02093	1,00000	------		
A(2)	Mann-W	0,04331	0,02093	0,77283	1,00000	------	
A(3)	Mann-W	0,08327	0,02093	0,77283	0,19127	0,24822	------
A(4)	Mann-W	0,02093	0,14893	1,00000	0,24822	0,77283	1,00000

Tabla 13.9.2.-Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Primer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	0,004038	1	0,004038	0,516733	0,484065
Fungicida	0,33402	6	0,055670	7,124019	0,001233*
Interacción	0,100626	6	0,016771	2,146187	0,112171
Dentro del grupo	0,109396	14	0,007814		

Tabla 13.9.3.- Valores de "p" de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). Primer ensayo.

Variable:	AUDPCstd	T-T	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)
T-T	LSD	------						
	Duncan	------						
	Scheffé	------						
A(-1)	LSD	0,00000	------					
	Duncan	0,00006	------					
	Scheffé	0,00000	------					
A(0)	LSD	0,00000	0,65810	------				
	Duncan	0,00014	0,64781	------				
	Scheffé	0,00000	0,99997	------				
A(1)	LSD	0,00000	0,01135	0,00379	------			
	Duncan	0,00003	0,01456	0,00569	------			
	Scheffé	0,00000	0,42076	0,23516	------			
A(2)	LSD	0,00000	0,02266	0,00792	0,76810	------		
	Duncan	0,00003	0,02444	0,01021	0,76086	------		
	Scheffé	0,00000	0,57046	0,35193	0,99999	------		
A(3)	LSD	0,00000	0,00376	0,00119	0,65524	0,46008	------	
	Duncan	0,00002	0,00563	0,00206	0,64487	0,47283	------	
	Scheffé	0,00000	0,23379	0,11473	0,99997	0,99897	------	
A(4)	LSD	0,00000	0,02297	0,00804	0,76356	0,99523	0,45651	------
	Duncan	0,00006	0,01933	0,00861	0,77062	0,99518	0,48449	------
	Scheffé	0,00000	0,57356	0,35458	0,99999	1,00000	0,99892	------
CA013	LSD	0,00000	0,00007	0,00002	0,05906	0,03140	0,14058	0,03099
	Duncan	0,00002	0,00014	0,00006	0,06360	0,03923	0,12865	0,04281
	Scheffé	0,00000	0,014400	0,00546	0,78671	0,64561	0,93432	0,64255

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.4.-Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo). Valores de la F del Análisis de Varianza. Primer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	11,292084	1	11,292084	3,36332	0,08801
Fungicida	21,150576	6	3,525096	1,04994	0,43554
Interacción	25,639956	6	4,273326	1,27279	0,33043
Dentro del grupo	47,003922	14	3,357423		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	0,185240	1	0,185240	0,69171	0,41954
Fungicida	5,33742	6	0,889507	3,32154	0,03008*
Interacción	4,411176	6	0,735196	2,74532	0,05603
Dentro del grupo	3,749186	14	0,267799		

Tabla 13.9.5.- Valores de "p" de la comparación de la variable "longitud de tallo" para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). Primer ensayo.

Variable:	Longitud de tallo	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
CA013	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,09044	------				
	Duncan	0,12051	------				
	Scheffé	0,76149	------				
A(0)	LSD	0,53977	0,25385	------			
	Duncan	0,56091	0,27762	------			
	Scheffé	0,99847	0,95734	------			
A(1)	LSD	0,96036	0,09885	0,57248	------		
	Duncan	0,96049	0,12419	0,57262	------		
	Scheffé	1,00000	0,78329	0,99904	------		
A(2)	LSD	0,31435	0,45129	0,68438	0,33755	------	
	Duncan	0,35177	0,45147	0,68452	0,36213	------	
	Scheffé	0,97730	0,99515	0,99986	0,98229	------	
A(3)	LSD	0,21063	0,00737	0,07273	0,19453	0,03360	------
	Duncan	0,21075	0.01343	0,09396	0,21649	0,04985	------
	Scheffé	0,93352	0,21031	0,70615	0,92157	0,50653	------
A(4)	LSD	0,08365	0,00247	0,02591	0,07641	0,01150	0,59067
	Duncan	0,09792	0,00525	0,03942	0,09828	0,02012	0,59080
	Scheffé	0,74196	0,09815	0,44399	0,71889	0,27906	0,99927

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.6.-Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de sistema radicular y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza. Primer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	0,000027	1	0,000027	1,59427	0,22734
Fungicida	0,00003	6	0,000005	0,28333	0,93533
Interacción	0,000084	6	0,000014	0,80724	0,58096
Dentro del grupo	0,000238	14	0,000017		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de parte aérea transformada

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	0,000002	1	0,000002	0,66242	0,42933
Fungicida	0,000018	6	0,000003	0,92212	0,50864
Interacción	0,00003	6	0,000005	1,68062	0,19827
Dentro del grupo	0,000042	14	0,000003		

Tabla 13.9.7.-Efecto de la concentración de inóculo, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos secos de sistema radicular y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza. Primer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso seco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	0,0000008	1	0,0000008	3,04813	0,10273
Fungicida	0,0000006	6	0,0000001	0,50971	0,79132
Interacción	0,0000012	6	0,0000002	0,85085	0,55253
Dentro del grupo	0,000042	14	0,0000003		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso seco de parte aérea

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Concentración	0,0000048	1	0,0000048	2,00797	0,17834
Fungicida	0,000168	6	0,0000028	1,16245	0,37916
Interacción	0,0000174	6	0,0000029	1,17604	0,37281
Dentro del grupo	0,0000336	14	0,0000024		

Tabla 13.9.8.-Segundo ensayo. Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación, para aquellos tiempos en que el ANOVA detectó diferencias significativas (p< 0,05). Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Control = plantas inoculadas con uno de los dos aislados estudiados pero sin aplicación del fungicida; CA013= plantas inoculadas con el aislado CA013 sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con el aislado CL039 sin aplicación del fungicida; A(i)=plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tiempo (sdi):	1	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	1,000000	------						
	Duncan	1,000000	------						
	Scheffé	1,000000	------						
CL039	LSD	0,001623	0,001623	------					
	Duncan	0,180069	0,127315	------					
	Scheffé	0,162667	0,162667	------					
A(-1)-39	LSD	0,105806	0,105806	0,001967	------				
	Duncan	0,726741	0,409312	0,150232	------				
	Scheffé	0,927063	0,927063	0,183372	------				
A(0)-39	LSD	0,158169	0,158169	0,008281	0,522528	------			
	Duncan	0,547211	0,158317	0,206417	0,957407	------			
	Scheffé	0,967454	0,967454	0,407775	0,999878	------			
A(1)-39	LSD	0,047726	0,047726	0,072670	0,104209	0,303567	------		
	Duncan	0,688114	0,454882	0,595229	0,721516	0,303709	------		
	Scheffé	0,793241	0,793241	0,871934	0,925151	0,995998	------		
A(2)-39	LSD	0,005143	0,005143	0,182648	0,038584	0,131624	0,609086	------	
	Duncan	0,224309	0,137785	0,182789	0,795046	0,799145	0,981089	------	
	Scheffé	0,319468	0,319468	0,977281	0,748383	0,951423	0,999978	------	
A(3)-39	LSD	0,002934	0,002934	0,003281	0,820399	0,678163	0,155929	0,060664	------
	Duncan	0,209657	0,140255	0,154335	0,820524	0,678299	0,541926	0,766282	------
	Scheffé	0,233188	0,233188	0,248797	0,999999	0,999995	0,966352	0,840052	------
A(4)-39	LSD	0,000076	0,000076	0,115778	0,064994	0,205613	0,802292	0,792997	0,099831
	Duncan	0,016378	0,011785	0,438080	0,787617	0,647606	0,802407	0,793117	0,706661
	Scheffé	0,018262	0,018262	0,937816	0,852597	0,983698	0,999999	0,999999	0,919603

Tiempo (sdi):	3	T-T	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13
T-A	LSD	0,712610	------						
	Duncan	0,712740	------						
	Scheffé	0,999998	------						
CA013	LSD	0,037638	0,017415	------					
	Duncan	0,384211	0,369093	------					
	Scheffé	0,742982	0,567965	------					
A(-1)-13	LSD	0,443417	0,262037	0,161409	------				
	Duncan	0,443586	0,742448	0,554746	------				
	Scheffé	0,999526	0,992728	0,968980	------				
A(0)-13	LSD	0,036849	0,017032	0,991697	0,158564	------			
	Duncan	0,600738	0,531434	0,991807	0,854804	------			
	Scheffé	0,738350	0,562907	1,000000	0,967644	------			
A(1)-13	LSD	0,018909	0,008504	0,741457	0,089385	0,749297	------		
	Duncan	0,565346	0,461514	0,996434	0,875610	0,749425	------		
	Scheffé	0,586763	0,413085	0,999999	0,904311	0,999999	------		
A(2)-13	LSD	0,002583	0,001123	0,226864	0,014293	0,230648	0,371680	------	
	Duncan	0,188787	0,131855	0,937881	0,476317	0,692661	0,371874	------	
	Scheffé	0,216262	0,128361	0,987979	0,523439	0,988612	0,998538	------	
A(3)-13	LSD	0,001622	0,000704	0,161359	0,009121	0,164244	0,275139	0,836515	------
	Duncan	0,179889	0,119864	0,974171	0,482776	0,864489	0,761202	0,836637	------
	Scheffé	0,162544	0,093946	0,968957	0,427254	0,970253	0,993972	1,000000	------
A(4)-13	LSD	0,130810	0,066000	0,516982	0,434470	0,510394	0,332424	0,071894	0,048010
	Duncan	0,479110	0,561862	0,517134	0,434642	0,952821	0,985038	0,817539	0,854808
	Scheffé	0,950811	0,855329	0,999866	0,999452	0,999849	0,997374	0,870129	0,794452

Tiempo (sdi):	3	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	0,628244	------						
	Duncan	0,628383	------						
	Scheffé	0,999986	------						
CL039	LSD	0,000000	0,000000	------					
	Duncan	0,001388	0,001131	------					
	Scheffé	0,000006	0,000012	------					
A(-1)-39	LSD	0,000058	0,000171	0,000141	------				
	Duncan	0,000586	0,000318	0,014024	------				
	Scheffé	0,014862	0,033964	0,029425	------				
A(0)-39	LSD	0,000006	0,000017	0,001531	0,296601	------			
	Duncan	0,000631	0,000373	0,079032	0,296746	------			
	Scheffé	0,002359	0,005497	0,156764	0,995574	------			
A(1)-39	LSD	0,000000	0,000000	0,064437	0,010966	0,095295	------		
	Duncan	0,000996	0,000803	0,275114	0,259337	0,690451	------		
	Scheffé	0,000125	0,000279	0,851055	0,465719	0,913345	------		
A(2)-39	LSD	0,000000	0,000000	0,294849	0,001545	0,016238	0,384731	------	
	Duncan	0,001132	0,000992	0,294995	0,079670	0,350675	0,384919	------	
	Scheffé	0,000031	0,000066	0,995461	0,157658	0,552102	0,998802	------	
A(3)-39	LSD	0,000002	0,000006	0,005517	0,121747	0,589677	0,241393	0,049860	------
	Duncan	0,000616	0,000623	0,138415	0,454698	0,589806	0,710501	0,468787	------
	Scheffé	0,000926	0,002142	0,320371	0,943387	0,999967	0,990232	0,802113	------
A(4)-39	LSD	0,000000	0,000000	0,036847	0,020071	0,157291	0,779047	0,255027	0,366375
	Duncan	0,000796	0,000587	0,378263	0,235055	0,545150	0,779176	0,731931	0,366565
	Scheffé	0,000198	0,000446	0,738340	0,600435	0,967027	0,999999	0,991961	0,998416

Tiempo (sdi):	4	T-T	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13
T-A	LSD	0,694361	------						
	Duncan	0,694498	------						
	Scheffé	0,999997	------						
CA013	LSD	0,011567	0,026791	------					
	Duncan	0,413468	0,495816	------					
	Scheffé	0,477085	0,666750	------					
A(-1)-13	LSD	0,690861	0,996191	0,027059	------				
	Duncan	0,992673	0,996290	0,298932	------				
	Scheffé	0,999997	1,000000	0,669023	------				
A(0)-13	LSD	0,035055	0,076376	0,601704	0,077072	------			
	Duncan	0,583941	0,612644	0,601837	0,318846	------			
	Scheffé	0,727364	0,880138	0,999975	0,881607	------			
A(1)-13	LSD	0,003119	0,007502	0,556202	0,007582	0,272912	------		
	Duncan	0,390590	0,547431	0,999670	0,427752	0,997998	------		
	Scheffé	0,241592	0,388387	0,999936	0,390429	0,993777	------		
A(2)-13	LSD	0,010125	0,023576	0,951289	0,023813	0,560396	0,597355	------	
	Duncan	0,515233	0,638215	0,951373	0,459082	0,969563	0,978685	------	
	Scheffé	0,448826	0,637429	1,000000	0,639734	0,999941	0,999972	------	
A(3)-13	LSD	0,006194	0,014664	0,776503	0,014816	0,423231	0,759007	0,823570	------
	Duncan	0,487423	0,635298	0,998017	0,487397	0,996246	0,759140	0,823693	------
	Scheffé	0,352346	0,529160	1,000000	0,531459	0,999344	1,000000	1,000000	------
A(4)-13	LSD	0,353619	0,587157	0,079521	0,590408	0,201013	0,024326	0,070780	0,045690
	Duncan	0,988998	0,976412	0,327018	0,590537	0,201147	0,648604	0,586050	0,673494
	Scheffé	0,998082	0,999965	0,886601	0,999968	0,982582	0,644632	0,867483	0,784271

Tiempo (sdi):	4	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	0,990570	------						
	Duncan	0,990694	------						
	Scheffé	1,000000	------						
CL039	LSD	0,000000	0,000000	------					
	Duncan	0,001388	0,001130	------					
	Scheffé	0,000011	0,000011	------					
A(-1)-39	LSD	0,000160	0,000165	0,000116	------				
	Duncan	0,001129	0,000311	0,011818	------				
	Scheffé	0,032344	0,032989	0,025411	------				
A(0)-39	LSD	0,000014	0,000014	0,001468	0,267504	------			
	Duncan	0,000737	0,000359	0,076039	0,267642	------			
	Scheffé	0,004637	0,004734	0,152640	0,993275	------			
A(1)-39	LSD	0,000000	0,000000	0,036752	0,016722	0,152681	------		
	Duncan	0,000810	0,000583	0,377548	0,201915	0,534187	------		
	Scheffé	0,000368	0,000375	0,737779	0,558751	0,964683	------		
A(2)-39	LSD	0,000000	0,000000	0,226071	0,001872	0,022505	0,329399	------	
	Duncan	0,001136	0,000992	0,226195	0,094583	0,441977	0,827643	------	
	Scheffé	0,000072	0,000074	0,987841	0,177854	0,626740	0,997254	------	
A(3)-39	LSD	0,000007	0,000007	0,002929	0,162918	0,759654	0,252325	0,042341	------
	Duncan	0,000769	0,000649	0,083689	0,558222	0,759786	0,252448	0,418336	------
	Scheffé	0,002720	0,002777	0,232945	0,969664	0,999999	0,991644	0,768314	------
A(4)-39	LSD	0,000000	0,000000	0,048635	0,012394	0,119579	0,889490	0,400267	0,202200
	Duncan	0,001014	0,000804	0,216573	0,285522	0,768091	0,889612	0,400454	0,982877
	Scheffé	0,000291	0,000297	0,797086	0,492037	0,941431	1,000000	0,999057	0,641069

Tiempo (sdi):	6	T-T	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13
T-A	LSD	0,347872							
	Duncan	0,348009							
	Scheffé	0,997911							
CA013	LSD	0,000541	0,004608	------					
	Duncan	0,047705	0,205087	------					
	Scheffé	0,078295	0,301016	------					
A(-1)-13	LSD	0,013869	0,095058	0,158343					
	Duncan	0,069492	0,095201	0,972394					
	Scheffé	0,516753	0,913002	0,967538					
A(0)-13	LSD	0,001763	0,014552	0,602249	0,359014	------			
	Duncan	0,052713	0,179400	0,979715	0,857183	------			
	Scheffé	0,171311	0,527446	0,999975	0,998231	------			
A(1)-13	LSD	0,000268	0,002280	0,754273	0,090352	0,407395			
	Duncan	0,050762	0,237385	0,997094	0,993730	0,999939			
	Scheffé	0,047315	0,200647	1,000000	0,905863	0,999157			
A(2)-13	LSD	0,002134	0,017450	0,545381	0,403545	0,932535	0,362577	------	
	Duncan	0,031348	0,086117	0,999588	0,403730	0,932640	0,999999	------	
	Scheffé	0,192751	0,568426	0,999921	0,999104	1,000000	0,998323	------	
A(3)-13	LSD	0,000400	0,003413	0,893360	0,125286	0,513567	0,857721	0,461589	
	Duncan	0,052741	0,236886	0,893487	0,990285	0,999231	0,857848	0,999988	
	Scheffé	0,063281	0,254482	1,000000	0,946425	0,999857	1,000000	0,999649	
A(4)-13	LSD	0,000666	0,005661	0,926405	0,185055	0,667430	0,685565	0,607572	0,820966
	Duncan	0,036918	0,149705	0,926512	0,895018	0,667563	0,999986	0,980791	0,999186
	Scheffé	0,090435	0,336155	1,000000	0,978062	0,999994	0,999996	0,999978	1,000000

Tiempo (sdi):	6	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	0,030209	------						
	Duncan	0,030346	------						
	Scheffé	0,694069	------						
CL039	LSD	0,000004	0,000000	------					
	Duncan	0,001693	0,001391	------					
	Scheffé	0,001635	0,000035	------					
A(-1)-39	LSD	0,008411	0,000047	0,002328	------				
	Duncan	0,008578	0,0005279	0,173172	------				
	Scheffé	0,410883	0,012555	0,203227	------				
A(0)-39	LSD	0,005216	0,000029	0,003782	0,829283	------			
	Duncan	0,027506	0,0009886	0,174034	0,829409	------			
	Scheffé	0,321909	0,008640	0,269766	1,000000	------			
A(1)-39	LSD	0,000358	0,000003	0,048425	0,171321	0,243420	------		
	Duncan	0,020769	0,001165	0,215766	0,979280	0,949807	------		
	Scheffé	0,058485	0,001095	0,796208	0,973194	0,990511	------		
A(2)-39	LSD	0,000006	0,000000	0,805593	0,004049	0,006548	0,078209	------	
	Duncan	0,001528	0,001134	0,805706	0,184302	0,169547	0,078358	------	
	Scheffé	0,002507	0,000051	0,999999	0,280320	0,362582	0,883961	------	
A(3)-39	LSD	0,003483	0,000020	0,005661	0,692377	0,856630	0,319974	0,009749	------
	Duncan	0,049530	0,001197	0,149724	0,992817	0,856758	0,817306	0,126558	------
	Scheffé	0,257449	0,006309	0,336181	0,999997	1,000000	0,996848	0,440955	------
A(4)-39	LSD	0,000372	0,000003	0,046828	0,176237	0,249896	0,986587	0,075751	0,327885
	Duncan	0,012386	0,000897	0,448965	0,882967	0,724025	0,986686	0,314398	0,328021
	Scheffé	0,060091	0,001127	0,789349	0,975055	0,991349	1,000000	0,878801	0,997193

Tiempo (sdi):	9	T-T	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13
T-A	LSD	0,340974	------						
	Duncan	0,341114	------						
	Scheffé	0,997686	------						
CA013	LSD	0,000012	0,000092	------					
	Duncan	0,001975	0,006040	------					
	Scheffé	0,003962	0,021047	------					
A(-1)-13	LSD	0,012728	0,090633	0,004769	------				
	Duncan	0,064124	0,090779	0,128997	------				
	Scheffé	0,497832	0,906308	0,306705	------				
A(0)-13	LSD	0,000183	0,001601	0,211446	0,070529	------			
	Duncan	0,003287	0,008881	0,924460	0,070665	------			
	Scheffé	0,035690	0,161268	0,985008	0,866877	------			
A(1)-13	LSD	0,000039	0,000326	0,569518	0,016682	0,482976	------		
	Duncan	0,002977	0,010952	0,569653	0,201499	0,941061	------		
	Scheffé	0,010703	0,054574	0,999951	0,558196	0,999756	------		
A(2)-13	LSD	0,000119	0,001034	0,286152	0,048270	0,846439	0,609497	------	
	Duncan	0,004397	0,015860	0,776102	0,215167	0,846561	0,609643	------	
	Scheffé	0,025778	0,121546	0,994855	0,795554	1,000000	0,999978	------	
A(3)-13	LSD	0,000002	0,000011	0,328837	0,000513	0,033670	0,130822	0,049806	------
	Duncan	0,001720	0,002641	0,827041	0,045426	0,753925	0,797208	0,702343	------
	Scheffé	0,000716	0,003792	0,997232	0,075412	0,718417	0,950820	0,801892	------
A(4)-13	LSD	0,000007	0,000056	0,824071	0,002897	0,145561	0,431352	0,201808	0,446620
	Duncan	0,002131	0,006217	0,824193	0,138698	0,963442	0,912907	0,914745	0,446787
	Scheffé	0,002690	0,014376	1,000000	0,231423	0,960703	0,999424	0,982780	0,999550

Tiempo (sdi):	9	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	0,159455	------						
	Duncan	0,159602	------						
	Scheffé	0,968069	------						
CL039	LSD	0,000019	0,000001	------					
	Duncan	0,003754	0,001578	------					
	Scheffé	0,005957	0,000489	------					
A(-1)-39	LSD	0,002262	0,000088	0,041798	------				
	Duncan	0,002411	0,000743	0,922126	------				
	Scheffé	0,199695	0,020464	0,765572	------				
A(0)-39	LSD	0,001974	0,000077	0,047183	0,951866	------			
	Duncan	0,010848	0,001695	0,850392	0,951960	------			
	Scheffé	0,183759	0,018459	0,790901	1,000000	------			
A(1)-39	LSD	0,000526	0,000021	0,141707	0,520918	0,560215	------		
	Duncan	0,017084	0,001973	0,822027	0,999331	0,969511	------		
	Scheffé	0,076826	0,006709	0,958347	0,999875	0,999940	------		
A(2)-39	LSD	0,000066	0,000003	0,561277	0,127060	0,141312	0,357167	------	
	Duncan	0,007144	0,001579	0,561416	0,990862	0,959876	0,855467	------	
	Scheffé	0,016375	0,001328	0,999994	0,947879	0,958097	0,998181	------	
A(3)-39	LSD	0,000826	0,000033	0,041798	0,656717	0,700589	0,841563	0,266072	------
	Duncan	0,012861	0,001618	0,899057	0,988815	0,700724	0,841688	0,962711	------
	Scheffé	0,104729	0,009498	0,918469	0,999992	0,999997	1,000000	0,993136	------
A(4)-39	LSD	0,000226	0,000009	0,098979	0,313538	0,342177	0,706855	0,580446	0,565867
	Duncan	0,013592	0,001821	0,744265	0,999261	0,986998	0,706987	0,580579	0,971071
	Scheffé	0,041795	0,003481	0,992855	0,996538	0,997726	0,999998	0,999960	0,999946

Tiempo (sdi):	7	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	0,016963	------						
	Duncan	0,017119	------						
	Scheffé	0,562001	------						
CL039	LSD	0,000005	0,000000	------					
	Duncan	0,001790	0,001390	------					
	Scheffé	0,001881	0,000026	------					
A(-1)-39	LSD	0,003652	0,000012	0,006465	------				
	Duncan	0,019567	0,000708	0,269103	------				
	Scheffé	0,264471	0,004060	0,360231	------				
A(0)-39	LSD	0,015901	0,000049	0,001443	0,506554	------			
	Duncan	0,016050	0,000537	0,114938	0,506710	------			
	Scheffé	0,547360	0,012969	0,150962	0,999838	------			
A(1)-39	LSD	0,001773	0,000006	0,013006	0,748568	0,329049	------		
	Duncan	0,026344	0,000731	0,297459	0,748696	0,827268	------		
	Scheffé	0,171907	0,002322	0,503576	0,999999	0,997240	------		
A(2)-39	LSD	0,000012	0,000000	0,665230	0,016659	0,003833	0,032695	------	
	Duncan	0,001986	0,001134	0,665364	0,357339	0,176028	0,345906	------	
	Scheffé	0,004000	0,000051	0,999999	0,557886	0,271837	0,711860	------	
A(3)-39	LSD	0,001338	0,000005	0,017076	0,656912	0,273557	0,900994	0,042127	------
	Duncan	0,040851	0,001008	0,205498	0,988840	0,966248	0,901112	0,191127	------
	Scheffé	0,143860	0,001871	0,563505	0,999992	0,993834	1,000000	0,767235	------
A(4)-39	LSD	0,000171	0,000000	0,106126	0,185051	0,054593	0,306424	0,223330	0,366449
	Duncan	0,010585	0,001029	0,410255	0,895013	0,732536	0,801592	0,223455	0,366640
	Scheffé	0,034037	0,000392	0,927439	0,978060	0,820046	0,996161	0,987355	0,998418

Tiempo (sdi):	8	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39
T-A	LSD	0,167057	------						
	Duncan	0,167206	------						
	Scheffé	0,971461	------						
CL039	LSD	0,000032	0,000002	------					
	Duncan	0,005698	0,001752	------					
	Scheffé	0,009288	0,000792	------					
A(-1)-39	LSD	0,004469	0,000183	0,037932	------				
	Duncan	0,062429	0,006433	0,610521	------				
	Scheffé	0,296039	0,035748	0,744682	------				
A(0)-39	LSD	0,025011	0,001085	0,006998	0,432582	------			
	Duncan	0,025154	0,006131	0,405072	0,913679	------			
	Scheffé	0,651013	0,125555	0,375076	0,999434	------			
A(1)-39	LSD	0,008799	0,000363	0,020094	0,760188	0,628073	------		
	Duncan	0,045223	0,006002	0,585320	0,760320	0,628212	------		
	Scheffé	0,419957	0,059019	0,600703	0,999999	0,999985	------		
A(2)-39	LSD	0,000082	0,000004	0,672045	0,087046	0,017625	0,048184	------	
	Duncan	0,008585	0,001697	0,672176	0,658662	0,542471	0,691307	------	
	Scheffé	0,019304	0,001644	0,999994	0,900432	0,570700	0,795190	------	
A(3)-39	LSD	0,002797	0,000115	0,057586	0,834588	0,323724	0,608184	0,127451	------
	Duncan	0,080285	0,007388	0,515691	0,834712	0,983065	0,980912	0,470175	------
	Scheffé	0,226724	0,025165	0,830292	1,000000	0,997016	0,999977	0,948194	------
A(4)-39	LSD	0,000498	0,000022	0,226222	0,336643	0,090301	0,210983	0,421450	0,448228
	Duncan	0,028234	0,002948	0,685060	0,835272	0,878068	0,924018	0,421628	0,448395
	Scheffé	0,073907	0,006743	0,967867	0,997532	0,905781	0,984908	0,999324	0,999561

Tabla 13.9.9.-Segundo ensayo. Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad acumulada para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Tiempo (sdi):	5	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13	A(4)-13
T-T	LSD	0,534274	0,002927	0,049624	0,006702	0,000614	0,004122	0,002114	0,001422
	Duncan	0,534421	0,139923	0,220376	0,090443	0,106315	0,113517	0,159651	0,161212
	Scheffé	0,999902	0,232811	0,801154	0,366918	0,085456	0,283105	0,191631	0,149570
T-A	LSD	------	0,011700	0,158525	0,025830	0,002516	0,016270	0,008532	0,005788
	Duncan	------	0,272922	0,158672	0,123452	0,256560	0,197297	0,332491	0,354237
	Scheffé	------	0,479545	0,967626	0,658390	0,212880	0,552531	0,413733	0,340113

Tiempo (sdi):	2	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	1,000000	0,000000	0,000133	0,000166	0,000111	0,000000	0,000002	0,000000
	Duncan	1,000000	0,001281	0,002543	0,001164	0,004137	0,001027	0,000847	0,001388
	Scheffé	1,000000	0,000351	0,028158	0,033299	0,024410	0,000382	0,000729	0,000003
T-A	LSD	------	0,000000	0,000133	0,000166	0,000111	0,000000	0,000002	0,000000
	Duncan	------	0,001023	0,000986	0,000313	0,002199	0,000812	0,000603	0,001130
	Scheffé	------	0,000351	0,028158	0,033299	0,024410	0,000382	0,000729	0,000003

Tiempo (sdi):	5	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	0,158191	0,000012	0,000804	0,009395	0,000893	0,000081	0,000051	0,000001
	Duncan	0,158339	0,002079	0,012533	0,009559	0,005094	0,003196	0,003706	0,001349
	Scheffé	0,967465	0,004284	0,102791	0,433315	0,110310	0,019203	0,013416	0,000621
T-A	LSD	------	0,000000	0,000032	0,000361	0,000035	0,000004	0,000003	0,000000
	Duncan	------	0,001281	0,001579	0,002214	0,001074	0,000958	0,001162	0,001395
	Scheffé	------	0,000353	0,009224	0,058817	0,009998	0,001547	0,001079	0,000056

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; T-T= control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero con fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.10.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	305,0239	1	305,0239	2,396066	0,132870
Fungicida	2948,1954	6	491,3659	3,859846	0,006244
Interacción	1158,2718	6	193,0453	1,516436	0,20921
Dentro del grupo	3556,532	28	127,3019		

Tabla 13.9.11.-Segundo ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "AUDPCstd" para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	AUDPCstd	Control	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
Control	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,00041	------				
	Duncan	0,03974	------				
	Scheffé	0,03496	------				
A(0)	LSD	0,00762	0,26623	------			
	Duncan	0,32005	0,26636	------			
	Scheffé	0,25778	0,96907	------			
A(1)	LSD	0,23663	0,00914	0,10683	------		
	Duncan	0,70593	0,23293	0,73782	------		
	Scheffé	0,95782	0,28650	0,82982	------		
A(2)	LSD	0,67410	0,00126	0,02077	0,43938	------	
	Duncan	0,67422	0,07047	0,43134	0,43953	------	
	Scheffé	0,99986	0,07975	0,44429	0,99548	------	
A(3)	LSD	0,18775	0,01279	0,13839	0,88900	0,36274	------
	Duncan	0,90265	0,16524	0,50265	0,88911	0,86253	------
	Scheffé	0,92962	0,34562	0,88057	0,99999	0,98905	------
A(4)	LSD	0,10399	0,02726	0,24206	0,64126	0,21969	0,74371
	Duncan	0,91602	0,13159	0,24218	0,98687	0,93503	0,74384
	Scheffé	0,82415	0,50576	0,96015	0,99975	0,94966	0,99996

Control = plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.12.-Segundo ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable: AUDPCstd		T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13	A(4)-13
T-T	LSD	0,42685	0,00188	0,14352	0,00928	0,00067	0,00071	0,00021	0,00604
	Duncan	0,42702	0,09512	0,51177	0,12115	0,08439	0,06114	0,04100	0,15835
	Scheffé	0,99938	0,17856	0,95947	0,43080	0,09118	0,09449	0,03974	0,34787
T-A	LSD	------	0,00524	0,30018	0,02472	0,00189	0,00199	0,00058	0,01637
	Duncan	------	0,14024	0,30032	0,11865	0,14512	0,09988	0,07466	0,19840
	Scheffé	------	0,32297	0,99579	0,64841	0,17889	0,18475	0,08297	0,55403

Variable	AUDPCstd	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	0,42685	0,00000	0,00686	0,00346	0,00012	0,000006	0,00090	0,00005
	Duncan	0,42702	0,00126	0,00703	0,01858	0,00451	0,00146	0,01396	0,00381
	Scheffé	0,99938	0,00026	0,37132	0,25664	0,02639	0,00229	0,11105	0,01380
T-A	LSD	------	0,00000	0,00113	0,00056	0,00002	0,00000	0,00015	0,00000
	Duncan	------	0,00139	0,00638	0,00905	0,00196	0,00133	0,00536	0,00180
	Scheffé	------	0,00007	0,12921	0,08096	0,00663	0,00057	0,03065	0,00343

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.13.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo). Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	8,337386	1	8,337386	1,659226	0,209054
Fungicida	34,673256	6	5,778876	1,150056	0,362410
Interacción	105,2265	6	17,53775	3,490194	0,011503
Dentro del grupo	130,64646	26	5,024864		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	12,51842	1	12,51842	12,56176	0,001515
Fungicida	5,3388	6	0,880980	0,884029	0,520471
Interacción	10,099764	6	1,683294	1,689120	0,163561
Dentro del grupo	25,9103	26	0,996550		

Tabla 13.9.14.-Efecto del momento de aplicación del fungicida sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en plantas de *Cupressus arizonica* inoculadas con CA013. Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Fungicida	281,609619	8	35,2012024	4,73819256	0,00398499
Error	118,867943	16	7,42924643		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Fungicida	15,27913	8	1,90989125	1,25518954	0,33134297
Error	24,3455334	16	1,52159584		

Tabla 13.9.15.-Efecto del momento de aplicación del fungicida sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en plantas de *Cupressus arizonica* inoculadas con CL039. Valores de la F del Análisis de Varianza. Segundo ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Fungicida	59,31842	8	7,414802	7,193809	0,000264
Error	18,55295	18	1,030719		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Fungicida	5,604623	8	0,700577	3,470875	0,013480
Error	3,633205	18	0,201844		

Tabla 13.9.16.-Segundo ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "longitud de tallo" para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación con el aislado CL039. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Longitud de tallo	CL039	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)	T-T
CL039	LSD	------							
	Duncan	------							
	Scheffé	------							
A(-1)	LSD	0,61702	------						
	Duncan	0,64692	------						
	Scheffé	0,99998	------						
A(0)	LSD	0,79481	0,80929	------					
	Duncan	0,80631	0,80941	------					
	Scheffé	0,99999	0,99999	------					
A(1)	LSD	0,39611	0,18504	0,27197	------				
	Duncan	0,39631	0,23001	0,31214	------				
	Scheffé	0,99899	0,97805	0,99369	------				
A(2)	LSD	0,00312	0,00100	0,00173	0,02048	------			
	Duncan	0,00506	0,00242	0,00369	0,02596	------			
	Scheffé	0,24167	0,11937	0,16965	0,60516	------			
A(3)	LSD	0,38573	0,70829	0,53978	0,09568	0,00043	------		
	Duncan	0,43887	0,72406	0,57412	0,13788	0,00126	------		
	Scheffé	0,99882	0,99999	0,99991	0,91390	0,06681	------		
A(4)	LSD	0,58619	0,96426	0,77487	0,17166	0,00091	0,74172	------	
	Duncan	0,62411	0,96437	0,78742	0,22104	0,00237	0,74185	------	
	Scheffé	0,99996	1,00000	0,99999	0,97332	0,11160	0,99999	------	
T-T	LSD	0,85547	0,74959	0,93775	0,30579	0,00207	0,49029	0,71604	------
	Duncan	0,85560	0,76338	0,93785	0,33195	0,00393	0,53416	0,73934	------
	Scheffé	1,00000	0,99999	1,00000	0,99612	0,18920	0,99978	0,99999	------
T-A	LSD	0,34525	0,15665	0,23335	0,92148	0,02521	0,07956	0,14499	0,26357
	Duncan	0,37153	0,20455	0,28110	0,92159	0,02535	0,12044	0,19517	0,30355
	Scheffé	0,99782	0,96671	0,98904	1,00000	0,65285	0,88669	0,96036	0,99288

CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. T-T= control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero tratado con el fungicida.

Tabla 13.9.17.-Segundo ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "longitud de raíz principal" para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación con los aislados CA013 y CL039. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Longitud de raíz	CA013	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)	T-T
CA013	LSD	------							
	Duncan	------							
	Scheffé	------							
A(-1)	LSD	0,004123	------						
	Duncan	0,006225	------						
	Scheffé	0,270186	------						
A(0)	LSD	0,095254	0,098246	------					
	Duncan	0,111853	0,133088	------					
	Scheffé	0,908561	0,912945	------					
A(1)	LSD	0,438007	0,011609	0,290571	------				
	Duncan	0,436277	0,027262	0,354421	------				
	Scheffé	0,999442	0,463428	0,994830	------				
A(2)	LSD	0,264200	0,026467	0,500932	0,691269	------			
	Duncan	0,275297	0,051161	0,545365	0,706423	------			
	Scheffé	0,992460	0,651502	0,999807	0,999996	------			
A(3)	LSD	0,243929	0,060658	0,660313	0,603499	0,868589	------		
	Duncan	0,221682	0,065023	0,641391	0,602444	0,860827	------		
	Scheffé	0,989937	0,832344	0,999993	0,999973	1,000000	------		
A(4)	LSD	0,497054	0,009195	0,245593	0,911955	0,612407	0,537388	------	
	Duncan	0,471903	0,023647	0,316519	0,916579	0,649282	0,547671	------	
	Scheffé	0,999793	0,414464	0,990173	1,000000	0,999978	0,999900	------	
T-T	LSD	0,007419	0,758667	0,168243	0,022005	0,048866	0,101295	0,017519	------
	Duncan	0,010376	0,770792	0,189993	0,043802	0,079888	0,098576	0,038444	------
	Scheffé	0,372007	0,999999	0,970194	0,608387	0,788939	0,917163	0,555466	------
T-A	LSD	0,000527	0,290586	0,011610	0,001166	0,002738	0,008554	0,000921	0,178986
	Duncan	0,000890	0,315348	0,023065	0,004021	0,007891	0,010227	0,003488	0,224145
	Scheffé	0,070935	0,994832	0,463444	0,123009	0,212223	0,399876	0,104851	0,974510

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. T-T= control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero tratado con el fungicida.

Variable: Longitud de raíz		CL039	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)	T-T
CL039	LSD	-----							
	Duncan	-----							
	Scheffé	-----							
A(-1)	LSD	0,203282	------						
	Duncan	0,227104	------						
	Scheffé	0,983142	------						
A(0)	LSD	0,885762	0,255472	------					
	Duncan	0,885887	0,255607	------					
	Scheffé	1,000000	0,992012	------					
A(1)	LSD	0,564433	0,072557	0,473108	------				
	Duncan	0,564570	0,095474	0,497648	------				
	Scheffé	0,999945	0,871674	0,999711	------				
A(2)	LSD	0,048999	0,002976	0,036679	0,144853	------			
	Duncan	0,066783	0,006105	0,055539	0,165515	------			
	Scheffé	0,798598	0,235102	0,737342	0,960281	------			
A(3)	LSD	0,135328	0,009883	0,104581	0,341769	0,590656	------		
	Duncan	0,155313	0,016889	0,132841	0,341909	0,590785	------		
	Scheffé	0,954104	0,443799	0,925601	0,997713	0,999967	------		
A(4)	LSD	0,174682	0,927070	0,221167	0,060797	0,002422	0,008084	------	
	Duncan	0,210416	0,927176	0,245651	0,087016	0,005462	0,015273	------	
	Scheffé	0,974482	1,000000	0,986957	0,840458	0,208095	0,403022	------	
T-T	LSD	0,083293	0,613935	0,108673	0,026281	0,000949	0,003211	0,679062	------
	Duncan	0,114789	0,633821	0,137509	0,043860	0,002468	0,007076	0,679198	------
	Scheffé	0,893806	0,999980	0,930357	0,662361	0,114898	0,245708	0,999995	------
T-A	LSD	0,000694	0,012751	0,000960	0,000189	0,000007	0,000023	0,015534	0,037056
	Duncan	0,001562	0,019203	0,001904	0,000511	0,000044	0,000089	0,019914	0,037185
	Scheffé	0,093009	0,498223	0,115766	0,036629	0,002750	0,007044	0,542096	0,739579

CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación. T-T= control sin inóculo y sin fungicida; T-A= control sin inóculo pero tratado con el fungicida.

Tabla 13.9.18.-Tercer ensayo. Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación, para aquellos tiempos en que el ANOVA detectó diferencias significativas (p< 0,05). Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Control = plantas inoculadas con uno de los dos aislados estudiados pero sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tiempo (sdi):	4	Control	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
Control	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,24340	------				
	Duncan	0,29720	------				
	Scheffé	0,96071	------				
A(0)	LSD	0,00269	0,44748	------			
	Duncan	0,00589	0,04486	------			
	Scheffé	0,13390	0,62506	------			
A(1)	LSD	0,37121	0,77938	0,02414	------		
	Duncan	0,39951	0,79269	0,03582	------		
	Scheffé	0,99004	0,99998	0,47779	------		
A(2)	LSD	0,88359	0,19121	0,00183	0,29974	------	
	Duncan	0,88369	0,24900	0,00456	0,34437	------	
	Scheffé	0,99999	0,93214	0,10360	0,97830	------	
A(3)	LSD	0,64106	0,47729	0,00869	0,66511	0,54087	------
	Duncan	0,64119	0,51830	0,01568	0,66524	0,56531	------
	Scheffé	0,99975	0,99717	0,27827	0,99983	0,99879	------
A(4)	LSD	0,27427	0,93954	0,03800	0,83803	0,21704	0,52494
	Duncan	0,31852	0,93964	0,04752	0,83815	0,26955	0,54993
	Scheffé	0,97158	1,00000	0,58505	0,99999	0,94825	0,99849

Tiempo (sdi):	5	Control	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
Control	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(-1)	LSD	0,08110	------				
	Duncan	0,12129	------				
	Scheffé	0,76888	------				
A(0)	LSD	0,00099	0,07263	------			
	Duncan	0,00258	0,07276	------			
	Scheffé	0,06740	0,74307	------			
A(1)	LSD	0,27427	0,49309	0,01616	------		
	Duncan	0,31851	0,51909	0,02469	------		
	Scheffé	0,97158	0,99769	0,39127	------		
A(2)	LSD	0,69357	0,16910	0,00280	0,47929	------	
	Duncan	0,69369	0,21782	0,00612	0,50568	------	
	Scheffé	0,99991	0,91425	0,13756	0,99724	------	
A(3)	LSD	0,36501	0,38167	0,01022	0,84733	0,60528	------
	Duncan	0,39336	0,42583	0,01821	0,84745	0,60541	------
	Scheffé	0,98933	0,99115	0,30523	0,99999	0,99954	------
A(4)	LSD	0,10177	0,90709	0,04572	0,56872	0,20631	0,44714
	Duncan	0,14078	0,90720	0,04700	0,56885	0,24785	0,47429
	Scheffé	0,81954	0,99999	0,68556	0,99919	0,94209	0,99589

Tabla 13.9.19.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	650,625671	1	650,625671	2,768924	0,107264
Fungicida	3098,5517	6	516,425293	2,197796	0,073171
Interacción	2163,3512	6	360,558533	1,534460	0,203551
Dentro del grupo	6579,272	28	234,974091		

Tabla 13.9.20.-Tercer ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	AUDPCstd	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)	A(4)
A(-1)	LSD	------					
	Duncan	------					
	Scheffé	------					
A(0)	LSD	0,03823	------				
	Duncan	0,03835	------				
	Scheffé	0,58649	------				
A(1)	LSD	0,96766	0,03500	------			
	Duncan	0,96777	0,04394	------			
	Scheffé	1,00000	0,56504	------			
A(2)	LSD	0,49904	0,00792	0,52482	------		
	Duncan	0,54773	0,01584	0,56347	------		
	Scheffé	0,99786	0,26362	0,99849	------		
A(3)	LSD	0,65490	0,01382	0,68428	0,81737	------	
	Duncan	0,68513	0,02398	0,70253	0,81750	------	
	Scheffé	0,99980	0,36037	0,99988	0,99999	------	
A(4)	LSD	0,88263	0,02760	0,91470	0,59625	0,76427	------
	Duncan	0,89017	0,04053	0,91480	0,61851	0,76439	------
	Scheffé	0,99999	0,50865	0,99999	0,99946	0,99998	------
Control	LSD	0,28789	0,00293	0,30611	0,69330	0,53279	0,35809
	Duncan	0,34994	0,00699	0,36125	0,69343	0,55751	0,40263
	Scheffé	0,97539	0,14192	0,97972	0,99990	0,99864	0,98847

Control= plantas inoculadas con CA013 o CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.21.-Tercer ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones dos a dos entre los controles sanos y los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	AUDPCstd	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13	A(4)-13
T-T	LSD	0,930708	0,000070	0,000159	0,016999	0,000301	0,001253	0,000005	0,000041
	Duncan	0,930805	0,000323	0,000648	0,026068	0,001092	0,003530	0,000041	0,000219
	Scheffé	1,000000	0,211735	0,307685	0,960405	0,398170	0,634970	0,051353	0,162905
T-A	LSD	------	0,000090	0,000205	0,020866	0,000386	0,001589	0,000007	0,000053
	Duncan	------	0,000385	0,000764	0,026939	0,001280	0,004047	0,000047	0,000263
	Scheffé	------	0,238556	0,341611	0,970825	0,436592	0,675142	0,059934	0,185115

Variable:	AUDPCstd	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	0,930708	0,000050	0,002204	0,080757	0,001020	0,000015	0,007836	0,004184
	Duncan	0,930805	0,000249	0,005466	0,097085	0,003137	0,000091	0,014408	0,008979
	Scheffé	1,000000	0,180079	0,729015	0,998571	0,599571	0,093493	0,899529	0,824693
T-A	LSD	------	0,000065	0,002779	0,095885	0,001295	0,000019	0,009735	0,005239
	Duncan	------	0,000299	0,006163	0,096043	0,003636	0,000108	0,015502	0,009929
	Scheffé	------	0,203994	0,765425	0,999191	0,640450	0,107808	0,920162	0,853984

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.22.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo). Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	4,037349	1	4,037349	3,44472	0,07401
Fungicida	6,056964	6	1,009494	0,86132	0,53499
Interacción	16,181766	6	2,696961	2,30109	0,06239
Dentro del grupo	32,817036	28	1,172037		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,733539	1	0,733539	3,51978	0,07110
Fungicida	2,73729	6	0,456215	2,18908	0,07416
Interacción	1,615914	6	0,269319	1,29229	0,29289
Dentro del grupo	5,835312	28	0,208404		

Tabla 13.9.23.-Efecto del momento de aplicación del fungicida sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en plantas de *Cupressus arizonica* inoculadas con los aislados CA013 y CL039. Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	40,89033	15	2,726022	1,548792	0,145980
Error	56,32304	32	1,760095		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	10,34034	15	0,689356	3,285005	0,002306
Error	6,715168	32	0,209849		

Tabla 13.9.24.-Tercer ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "longitud de tallo" para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Longitud de tallo	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13	A(4)-13
T-T	LSD	0,594268	0,001747	0,039825	0,000586	0,004980	0,000520	0,000387	0,009563
	Duncan	0,594389	0,005700	0,066737	0,002354	0,013605	0,002206	0,001762	0,022817
	Scheffé	1,000000	0,691002	0,991054	0,505140	0,847614	0,485352	0,437493	0,918576
T-A	LSD	------	0,007078	0,118347	0,002524	0,018658	0,002254	0,001702	0,033729
	Duncan	------	0,018405	0,161341	0,008204	0,040159	0,007715	0,006260	0,063441
	Scheffé	------	0,888898	0,999631	0,750548	0,965413	0,732645	0,686642	0,987428

Variable:	Longitud de tallo	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	0,594268	0,001282	0,022392	0,098277	0,034221	0,000053	0,052649	0,141521
	Duncan	0,594389	0,004530	0,045022	0,128869	0,061675	0,000302	0,079901	0,163962
	Scheffé	1,000000	0,638819	0,973917	0,999257	0,987782	0,185536	0,995289	0,999827
T-A	LSD	------	0,005296	0,071833	0,252677	0,103876	0,000250	0,150136	0,339646
	Duncan	------	0,014933	0,114752	0,280568	0,150679	0,001185	0,187840	0,339786
	Scheffé	------	0,855326	0,997959	0,999993	0,999392	0,370168	0,999868	0,999999

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.25.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de raíz y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,009465	1	0,009465	21,60605	0,00007
Fungicida	0,004524	6	0,000754	1,72247	0,15259
Interacción	0,00138	6	0,000230	0,52683	0,78307
Dentro del grupo	0,012264	28	0,000438		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de parte aérea

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,007845	1	0,007845	21,80967	0,00007
Fungicida	0,003552	6	0,000592	1,64691	0,17139
Interacción	0,001974	6	0,000329	0,91478	0,49893
Dentro del grupo	0,010052	28	0,000359		

Tabla 13.9.26.-Efecto del momento de aplicación del fungicida sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de sistema radicular y parte aérea) en plantas de *Cupressus arizonica* inoculadas con los aislados CA013 y CL039. Valores de la F del Análisis de Varianza. Tercer ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,018375	15	0,001225	2,471175	0,015539
Error	0,01584	32	0,000495		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de parte aérea

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,01635	15	0,001092	2,760607	0,007771
Error	0,01264	32	0,000395		

Tabla 13.9.27.-Tercer ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "peso fresco de sistema radicular" para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Peso fresco de raíz	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13	A(4)-13
T-T	LSD	0,037525	0,453066	0,076008	0,723378	0,713436	0,558729	0,253455	0,290234
	Duncan	0,075970	0,505657	0,126387	0,723509	0,730513	0,596232	0,321834	0,354038
	Scheffé	0,989862	1,000000	0,998276	1,000000	1,000000	1,000000	0,999993	0,999997
T-A	LSD	------	0,168012	0,738736	0,079206	0,081351	0,124111	0,321375	0,281790
	Duncan	------	0,234366	0,763091	0,134510	0,135617	0,186740	0,385195	0,350782
	Scheffé	------	0,999924	1,000000	0,998481	0,998603	0,999695	0,999999	0,999997

Variable:	Peso fresco de raíz	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	0,037525	0,048430	0,000211	0,007204	0,014488	0,144674	0,039599	0,023242
	Duncan	0,075970	0,089884	0,001060	0,021491	0,036976	0,207878	0,078005	0,052913
	Scheffé	0,989862	0,994236	0,346287	0,890793	0,950705	0,999843	0,990945	0,975452
T-A	LSD	------	0,906640	0,053173	0,488675	0,680765	0,504505	0,980491	0,832284
	Duncan	------	0,912864	0,080597	0,530022	0,699481	0,554046	0,980593	0,832400
	Scheffé	------	1,000000	0,995403	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.28.-Tercer ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "peso fresco de parte aérea" para las comparaciones entre los controles sanos y los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Peso fresco parte aérea	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13	A(3)-13	A(4)-13
T-T	LSD	0,030480	0,671535	0,151134	0,029464	0,144097	0,426470	0,974279	0,163559
	Duncan	0,061963	0,690702	0,206101	0,061642	0,203299	0,470349	0,974399	0,212842
	Scheffé	0,984735	1,000000	0,999872	0,983744	0,999841	0,999999	1,000000	0,999913
T-A	LSD	------	0,075644	0,433393	0,988019	0,448857	0,154422	0,032770	0,408173
	Duncan	------	0,123197	0,486940	0,988121	0,491951	0,215100	0,063983	0,469583
	Scheffé	------	0,998251	0,999999	1,000000	1,000000	0,999885	0,986701	0,999999

Variable:	Peso fresco parte aérea	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39	A(3)-39	A(4)-39
T-T	LSD	0,030480	0,047143	0,004925	0,001075	0,025665	0,092854	0,001117	0,001899
	Duncan	0,061963	0,086056	0,014990	0,004473	0,056279	0,145458	0,004486	0,006880
	Scheffé	0,984735	0,993860	0,846188	0,608679	0,979220	0,999095	0,615239	0,704823
T-A	LSD	------	0,843138	0,454744	0,192585	0,939733	0,598517	0,197188	0,270852
	Duncan	------	0,843257	0,497600	0,257466	0,944181	0,621064	0,257066	0,326844
	Scheffé	------	1,000000	1,000000	0,999963	1,000000	1,000000	0,999996	0,999996

CA013= plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.29.-Cuarto ensayo. Valores de "p" de la comparación de medias de mortalidad acumulada para los tratamientos con el fungicida Aliette ® en distintos momentos referidos al de inoculación, para aquellos tiempos en que el ANOVA detectó diferencias significativas (p< 0,05). Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05). El tiempo se representa en semanas desde la inoculación (sdi). Control = plantas inoculadas con uno de los dos aislados estudiados pero sin aplicación del fungicida; CA013= plantas inoculadas con el aislado CA013 sin aplicación del fungicida; CL039= plantas inoculadas con el aislado CL039 sin aplicación del fungicida; A(i)=plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tiempo (sdi):	2	T-T	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13
T-A	LSD	0,590459	------					
	Duncan	0,719356	------					
	Scheffé	1,000000	------					
CA013	LSD	0,000000	0,000000	------				
	Duncan	0,000016	0,000012	------				
	Scheffé	0,001691	0,000841	------				
A(-1)-13	LSD	0,001471	0,000518	0,001474	------			
	Duncan	0,008569	0,004321	0,002221	------			
	Scheffé	0,571720	0,387271	0,571986	------			
A(0)-13	LSD	0,515116	0,280485	0,000004	0,016532	------		
	Duncan	0,560161	0,383782	0,000029	0,026502	------		
	Scheffé	1,000000	0,999994	0,021898	0,937070	------		
A(1)-13	LSD	0,000000	0,000000	0,940206	0,001234	0,000003	------	
	Duncan	0,000015	0,000011	0,938343	0,002086	0,000021	------	
	Scheffé	0,001473	0,000734	1,000000	0,539220	0,019492	------	
A(2)-13	LSD	0,003318	0,001178	0,000724	0,764156	0,031540	0,000606	------
	Duncan	0,015315	0,007922	0,001242	0,756811	0,045402	0,001152	------
	Scheffé	0,720652	0,530618	0,443532	1,000000	0,976867	0,413212	------
A(3)-13	LSD	0,000005	0,000002	0,130872	0,047863	0,000129	0,114299	0,025595
	Duncan	0,000107	0,000054	0,119552	0,057958	0,000328	0,121291	0,034950
	Scheffé	0,028874	0,014566	0,999554	0,990061	0,200735	0,999233	0,966871

Tiempo (sdi):	2	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39
T-A	LSD	0,590459	------					
	Duncan	0,719356	------					
	Scheffé	1,000000	------					
CL039	LSD	0,007257	0,002619	------				
	Duncan	0,026428	0,014100	------				
	Scheffé	0,845264	0,678267	------				
A(-1)-39	LSD	0,781267	0,870481	0,010299	------			
	Duncan	0,803935	0,891096	0,017122	------			
	Scheffé	1,000000	1,000000	0,889962	------			
A(0)-39	LSD	0,693300	0,963407	0,008190	0,919150	------		
	Duncan	0,739532	0,967385	0,014629	0,916614	------		
	Scheffé	1,000000	1,000000	0,861606	1,000000	------		
A(1)-39	LSD	0,215180	0,099650	0,154508	0,191381	0,161167	------	
	Duncan	0,291999	0,185532	0,175838	0,214785	0,191433	------	
	Scheffé	0,999964	0,998735	0,999787	0,999929	0,999826	------	
A(2)-39	LSD	0,040991	0,016007	0,494192	0,045258	0,036724	0,442573	------
	Duncan	0,092930	0,052563	0,480474	0,063167	0,054643	0,454029	------
	Scheffé	0,986093	0,934355	1,000000	0,988743	0,982637	1,000000	------
A(3)-39	LSD	0,001172	0,000413	0,500267	0,002160	0,001702	0,042542	0,181935
	Duncan	0,007541	0,003745	0,524382	0,004691	0,003927	0,062324	0,213652
	Scheffé	0,529602	0,351058	1,000000	0,642967	0,598694	0,987136	0,999906

Tiempo (sdi):	3	Control	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)
Control	LSD	------				
	Duncan	------				
	Scheffé	------				
A(-1)	LSD	0,00000	------			
	Duncan	0,00003	------			
	Scheffé	0,00026	------			
A(0)	LSD	0,00056	0,00660	------		
	Duncan	0,00121	0,00675	------		
	Scheffé	0,03121	0,19552	------		
A(1)	LSD	0,90333	0,00000	0,00071	------	
	Duncan	0,90882	0,00004	0,00120	------	
	Scheffé	0,99999	0,00031	0,03777	------	
A(2)	LSD	0,03434	0,00011	0,05471	0,04339	------
	Duncan	0,05083	0,00023	0,05484	0,05252	------
	Scheffé	0,51195	0,00840	0,63178	0,57138	------
A(3)	LSD	0,90519	0,00000	0,00071	0,99811	0,04320
	Duncan	0,90532	0,00004	0,00136	0,99821	0,05830
	Scheffé	0,99999	0,00030	0,03763	1,00000	0,57021

Tiempo (sdi):	4	T-T	T-A	CA013	A(-1)-13	A(0)-13	A(1)-13	A(2)-13
T-A	LSD	0,104979	------					
	Duncan	0,229385	------					
	Scheffé	0,998948	------					
CA013	LSD	0,000000	0,000000	------				
	Duncan	0,000014	0,000013	------				
	Scheffé	0,000096	0,000013	------				
A(-1)-13	LSD	0,000998	0,000040	0,000048	------			
	Duncan	0,002719	0,000259	0,000141	------			
	Scheffé	0,500358	0,103316	0,115114	------			
A(0)-13	LSD	0,000003	0,000000	0,008130	0,038236	------		
	Duncan	0,000062	0,000023	0,010341	0,058592	------		
	Scheffé	0,018420	0,002100	0,860636	0,983972	------		
A(1)-13	LSD	0,000000	0,000000	0,545258	0,000012	0,001992	------	
	Duncan	0,000011	0,000011	0,555676	0,000045	0,003320	------	
	Scheffé	0,000034	0,000005	1,000000	0,048312	0,627983	------	
A(2)-13	LSD	0,000003	0,000000	0,007991	0,038840	0,993953	0,001957	------
	Duncan	0,000060	0,000024	0,011497	0,057454	0,993860	0,003563	------
	Scheffé	0,018673	0,002129	0,858361	0,984469	1,000000	0,624681	------
A(3)-13	LSD	0,000000	0,000000	0,690847	0,000019	0,003250	0,834378	0,003193
	Duncan	0,000013	0,000011	0,681428	0,000064	0,004800	0,829158	0,005240
	Scheffé	0,000048	0,000007	1,000000	0,065681	0,716948	1,000000	0,713831

Tiempo (sdi):	4	T-T	T-A	CL039	A(-1)-39	A(0)-39	A(1)-39	A(2)-39
T-A	LSD	0,104979	------					
	Duncan	0,229385	------					
	Scheffé	0,998948	------					
CL039	LSD	0,000022	0,000001	------				
	Duncan	0,000205	0,000039	------				
	Scheffé	0,072036	0,008876	------				
A(-1)-39	LSD	0,072866	0,617819	0,000003	------			
	Duncan	0,123791	0,655340	0,000030	------			
	Scheffé	0,996594	1,000000	0,018795	------			
A(0)-39	LSD	0,000369	0,000015	0,303599	0,000031	------		
	Duncan	0,001508	0,000156	0,315028	0,000075	------		
	Scheffé	0,333903	0,056662	0,999997	0,089235	------		
A(1)-39	LSD	0,000070	0,000003	0,667651	0,000008	0,542187	------	
	Duncan	0,000460	0,000060	0,657627	0,000039	0,529296	------	
	Scheffé	0,143109	0,019384	1,000000	0,036409	1,000000	------	
A(2)-39	LSD	0,000014	0,000001	0,855214	0,000002	0,229056	0,541845	------
	Duncan	0,000155	0,000034	0,850654	0,000026	0,253963	0,552312	------
	Scheffé	0,052987	0,006351	1,000000	0,014127	0,999976	1,000000	------
A(3)-39	LSD	0,000006	0,000000	0,626250	0,000001	0,136692	0,363244	0,759926
	Duncan	0,000094	0,000027	0,635343	0,000023	0,164837	0,389749	0,752448
	Scheffé	0,031174	0,003617	1,000000	0,008717	0,999629	0,999999	1,000000

Tabla 13.9.30.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd). Valores de la F del Análisis de Varianza. Cuarto ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,465779	1	0,465779	86,89591	0,0000002
Fungicida	0,535074	6	0,089179	16,63737	0,0000122
Interacción	0,117948	6	0,019658	3,667453	0,0211491
Dentro del grupo	0,07504	14	0,005360		

Tabla 13.9.31.-Efecto del tratamiento sobre la variable AUDPC estándar (AUDPCstd), incluyendo todos los testigos. Valores de la F del Análisis de Varianza. Cuarto ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: AUDPCstd

Origén de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	2,23438	15	0,148958	20,648216	0,000000
Error	0,14428	20	0,007214		

Tabla 13.9.32.-Cuarto ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación con el aislado CA013. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	AUDPCstd	T-T	T-A	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
T-T	LSD	------						
	Duncan	------						
	Scheffé	------						
T-A	LSD	0,25515	------					
	Duncan	0,40255	------					
	Scheffé	0,99998	------					
A(-1)	LSD	0,00011	0,00000	------				
	Duncan	0,00095	0,00016	------				
	Scheffé	0,18438	0,04993	------				
A(0)	LSD	0,00029	0,00003	0,72027	------			
	Duncan	0,00151	0,00027	0,73585	------			
	Scheffé	0,30090	0,09083	1,00000	------			
A(1)	LSD	0,00000	0,00000	0,00048	0,00020	------		
	Duncan	0,00001	0,00001	0,00099	0,00053	------		
	Scheffé	0,00013	0,00003	0,37533	0,25405	------		
A(2)	LSD	0,00001	0,00000	0,41378	0,24498	0,00335	------	
	Duncan	0,00018	0,00005	0,43975	0,28948	0,00495	------	
	Scheffé	0,04941	0,01155	0,99999	0,99998	0,72275	------	
A(3)	LSD	0,00000	0,00000	0,00956	0,00421	0,20958	0,05577	------
	Duncan	0,00001	0,00001	0,01493	0,00831	0,21963	0,05968	------
	Scheffé	0,00130	0,00029	0,88114	0,76148	0,99995	0,99306	------
CA013	LSD	0,00000	0,00000	0,00126	0,00054	0,68343	0,00859	0,38791
	Duncan	0,00001	0,00001	0,00234	0,00127	0,67381	0,01091	0,37302
	Scheffé	0,00026	0,00006	0,54390	0,39451	1,00000	0,86779	0,99999

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; CA013 = plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.33.-Cuarto ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable AUDPC estándar (AUDPCstd) para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación con el aislado CL039. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	AUDPCstd	T-T	T-A	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
T-T	LSD	------						
	Duncan	------						
	Scheffé	------						
T-A	LSD	0,25515	------					
	Duncan	0,40255	------					
	Scheffé	0,99998	------					
A(-1)	LSD	0,19583	0,70670	------				
	Duncan	0,27107	0,73648	------				
	Scheffé	0,99993	1,00000	------				
A(0)	LSD	0,04033	0,00504	0,00621	------			
	Duncan	0,06407	0,01391	0,00793	------			
	Scheffé	0,98561	0,79109	0,82291	------			
A(1)	LSD	0,00109	0,00012	0,00024	0,17638	------		
	Duncan	0,00380	0,00070	0,00038	0,16339	------		
	Scheffé	0,51701	0,19034	0,27376	0,99988	------		
A(2)	LSD	0,00012	0,00001	0,00003	0,03948	0,43227	------	
	Duncan	0,00095	0,00017	0,00009	0,05250	0,45796	------	
	Scheffé	0,19775	0,05424	0,09997	0,98498	0,99999	------	
A(3)	LSD	0,00002	0,00000	0,00000	0,00766	0,13377	0,45532	------
	Duncan	0,00022	0,00005	0,00003	0,01376	0,17105	0,48055	------
	Scheffé	0,06068	0,01438	0,03333	0,85278	0,99959	0,99999	------
CL039	LSD	0,00006	0,00000	0,00002	0,02244	0,29629	0,78919	0,62919
	Duncan	0,00062	0,00011	0,00006	0,03502	0,33772	0,79489	0,61820
	Scheffé	0,13284	0,03416	0,06842	0,95923	0,99999	1,00000	1,00000

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.34.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo). Valores de la F del Análisis de Varianza. Cuarto ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,231595	1	0,231595	0,039700	0,844931
Fungicida	63,58956	6	10,590826	1,815507	0,167734
Interacción	16,56621	6	2,761035	0,473304	0,817098
Dentro del grupo	81,669462	14	5,833533		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	2,154938	1	2,154938	2,170147	0,162838
Fungicida	1,499934	6	0,249989	0,251753	0,950466
Interacción	5,89362	6	0,980227	0,987145	0,470080
Dentro del grupo	13,901874	14	0,992991		

Tabla 13.9.35.-Efecto del momento de aplicación del fungicida sobre los parámetros de crecimiento (longitudes de raíz principal y tallo) en plantas de *Cupressus arizonica* inoculadas con los aislados CA013 y CL039. Valores de la F del Análisis de Varianza. Cuarto ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	92,609235	15	6,173949	1,266772	0,305764
Error	97,47528	20	4,873764		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: longitud de tallo

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	16,248165	15	1,083211	1,391720	0,241500
Error	15,5665	20	0,778325		

Tabla 13.9.36.-Efecto del hongo inoculado, del momento de aplicación del fungicida y de la interacción sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de raíz y parte aérea). Valores de la F del Análisis de Varianza. Cuarto ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,000483	1	0,000483	12,361761	0,003425
Fungicida	0,000348	6	0,000058	1,499063	0,248791
Interacción	0,000636	6	0,000106	2,714731	0,057979
Dentro del grupo	0,000546	14	0,000039		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de parte aérea

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Hongo	0,000034	1	0,000034	0,071284	0,793367
Fungicida	0,001866	6	0,000311	0,646502	0,692548
Interacción	0,003438	6	0,000573	1,190849	0,366011
Dentro del grupo	0,006734	14	0,000481		

Tabla 13.9.37.-Efecto del momento de aplicación del fungicida sobre los parámetros de crecimiento (pesos frescos de sistema radicular y parte aérea) en plantas de *Cupressus arizonica* inoculadas con los aislados CA013 y CL039. Valores de la F del Análisis de Varianza. Cuarto ensayo.

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de raíz

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,001491	15	0,000099	2,828331	0,015756
Error	0,000703	20	0,000035		

ANÁLISIS DE VARIANZA
Variable: peso fresco de parte aérea

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F*	*Probabilidad*
Tratamiento	0,00642	15	0,000428	1,133897	0,389626
Error	0,00754	20	0,000377		

Tabla 13.9.38.-Cuarto ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "peso fresco de sistema radicular" transformada, para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación con el aislado CA013. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Peso fresco raíz transf.	T-T	T-A	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
T-A	LSD	0,553076	------					
	Duncan	0,697419	------					
	Scheffé	1,000000	------					
A(-1)	LSD	0,578334	0,942984	------				
	Duncan	0,659439	0,949079	------				
	Scheffé	1,000000	1,000000	------				
A(0)	LSD	0,182266	0,384457	0,487501	------			
	Duncan	0,292488	0,475592	0,498608	------			
	Scheffé	0,999907	0,999999	1,000000	------			
A(1)	LSD	0,782106	0,448599	0,472598	0,165487	------		
	Duncan	0,815837	0,549880	0,515071	0,211633	------		
	Scheffé	1,000000	0,999999	1,000000	0,999847	------		
A(2)	LSD	0,139028	0,307033	0,40806	0,891844	0,130440	------	
	Duncan	0,244051	0,410081	0,434126	0,888441	0,174116	------	
	Scheffé	0,999655	0,999997	0,999999	1,000000	0,999547	------	
A(3)	LSD	0,000176	0,000558	0,002324	0,011569	0,000421	0.015643	------
	Duncan	0,001720	0,003349	0,003461	0,012392	0,001109	0,013092	------
	Scheffé	0,235289	0,399391	0,656506	0,902997	0,354351	0,932381	------
CA013	LSD	0,802480	0,464290	0,486593	0,172097	0,981684	0,135881	0,000445
	Duncan	0,823066	0,560891	0,526723	0,217551	0,981187	0,179329	0,001114
	Scheffé	1,000000	1,000000	1,000000	0,999874	1,000000	0,999619	0,362828

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; CA013 = plantas inoculadas con CA013 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.

Tabla 13.9.39.-Cuarto ensayo. Valores de "p" de la comparación de la variable "peso fresco de sistema radicular" transformada, para las comparaciones dos a dos entre los tratamientos fungicidas aplicados en diferentes momentos en relación al momento de inoculación con el aislado CL039. Los valores subrayados resaltan diferencias significativas (p< 0,05).

Variable:	Peso fresco raíz transf.	T-T	T-A	A(-1)	A(0)	A(1)	A(2)	A(3)
T-A	LSD	0,553076	------					
	Duncan	0,697419	------					
	Scheffé	1,000000	------					
A(-1)	LSD	0,821627	0,794347	------				
	Duncan	0,849512	0,826287	------				
	Scheffé	1,000000	1,000000	------				
A(0)	LSD	0,707572	0,392956	0,603739	------			
	Duncan	0,759501	0,501582	0,634930	------			
	Scheffé	1,000000	0,999999	1,000000	------			
A(1)	LSD	0,985824	0,640199	0,857221	0,733608	------		
	Duncan	0,987425	0,702564	0,852723	0,753405	------		
	Scheffé	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	------		
A(2)	LSD	0,643418	0,982209	0,836386	0,469920	0,699584	------	
	Duncan	0,705296	0,984192	0,831227	0,510832	0,707251	------	
	Scheffé	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	------	
A(3)	LSD	0,240087	0,103982	0,227015	0,480432	0,299935	0,161011	------
	Duncan	0,352099	0,201830	0,275213	0,505068	0,347532	0,206810	------
	Scheffé	0,999982	0,998911	0,999974	1,000000	0,999996	0,999825	------
CL039	LSD	0,364928	0,171092	0,328916	0,641087	0,422733	0,240405	0,808426
	Duncan	0,470762	0,282472	0,376265	0,649907	0,465594	0,288954	0,802394
	Scheffé	0,999999	0,999870	0,999998	1,000000	0,999999	0,999982	1,000000

T-T = control sin inóculo y sin fungicida; CL039= plantas inoculadas con CL039 y sin aplicación del fungicida; A(i) = plantas inoculadas con el hongo y con aplicación del fungicida en la semana "i" respecto al momento de inoculación.