

**TESIS DE MAESTRÍA
EN BIOLOGÍA
OPCIÓN MICROBIOLOGÍA**

PEDECIBA

Montevideo, octubre de 2011

**EFECTO DEL GLIFOSATO
SOBRE COMUNIDADES
MICROBIANAS BENÉFICAS Y
PATÓGENAS DEL SUELO EN
URUGUAY**

Ana Paula Conde

Tutores:

**Dra. Nora Altier (Sección Protección Vegetal - INIA
Las Brujas)**

**Dra. Margarita Sicardi (Laboratorio de Microbiología
de Suelos – CIN, Facultad de Ciencias)**

Tribunal:

Dra. Alicia Arias (Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE)

Dr. Carlos Pérez (Unidad de Fitopatología, Facultad de Agronomía)

Dra. Silvana Vero (Cátedra de Microbiología, Facultad de Química)

Dra. Silvia Pereyra (Sección Protección Vegetal, INIA La Estanzuela)

Agradecimientos:

Quiero agradecer muy especialmente a Nora por su constante y valiosísima ayuda a lo largo de toda mi maestría, desde la elección de cursos, definición y conducción del trabajo de tesis, así como en la redacción final. Por su dedicación, su profesionalismo, su calidez, por estar siempre presente, por ser una referencia de excelencia y hacer tan agradable el trabajo de investigación.

A Silvia Pereyra por su permanente disposición y orientación en el diseño y conducción de los ensayos llevados a cabo en LE, y por la cuidadosa lectura del manuscrito.

A Margarita Sicardi por aceptarme como estudiante sin conocerme y por ser una excelente investigadora y persona.

A los integrantes del tribunal por su dedicación y excelentes aportes para mejorar este trabajo.

A la ANII por el apoyo económico brindado para llevar a cabo este estudio.

A Stella Zerbino por sus valiosos aportes en el análisis de los resultados y su disposición y compromiso.

A los compañeros del IIBCE por haberme apoyado cuando tuve la suerte de trabajar allí; en especial a Alicia, Naty y Lis por su dedicación.

A los compañeros de INIA LE que me ayudaron en la realización de los ensayos, en especial a Dahiana y Mónica.

A Beatriz por haber compartido muchos momentos en el laboratorio realizando tareas similares, por haberme ayudado siempre y por hacer tan agradable la convivencia durante tantas horas diarias.

A Alfredo, por ser siempre un aliado en quien confiar y por su ayuda en la toma de muestras, entre otras tantas tareas y por estar siempre dispuesto a dar una mano.

A Roberto Zoppolo por su incondicional apoyo para poder culminar la maestría, brindándome el tiempo necesario.

A la Cátedra de Microbiología de Facultad de Química, al Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE por brindarme los aislados utilizados.

A la compañía Cibeles S. A. por apostar a la investigación y brindarme las moléculas a evaluar.

A Caro Leoni por sus sabios consejos y enseñanzas y comentarios siempre certeros.

A Gabriel Ciappesoni y a Virginia por su gran ayuda en los análisis estadísticos de los datos.

A la Cátedra de Micología de Facultad de Ingeniería por recibirme en su laboratorio, en especial a Sebastián Martínez.

A mis amigas Noelia y María José, compañeras de estudio, por haber cruzado todos estos momentos juntas.

A Elena quien aportó excelentes ideas para la presentación final de la defensa.

A Fede por ayudarme en innumerables ocasiones y por sus sabios consejos.

A mis amigos que me han apoyado y confiado en mí en todo momento.

A mi familia por su constante apoyo en toda mi carrera, por estar siempre cuando los necesité, especialmente en el cuidado de mis niños, para permitirme estudiar. Sin ustedes seguramente no podría haber llegado hasta aquí.

En especial a Manuel por incentivar a continuar estudiando, permitiéndome mejorar día a día y bancarme en todo momento. A mis hijos Felipe y Martina que son mis grandes amores!!

Y a todos los que de alguna manera me han apoyado a lo largo de mi carrera.

EFFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE COMUNIDADES MICROBIANAS BENÉFICAS Y PATÓGENAS DEL SUELO EN URUGUAY

RESUMEN

Desde el año 2000 ha ocurrido una importante intensificación y especialización del sector agrícola, sustituyéndose el modelo de producción agrícola-ganadero por un sistema exclusivamente agrícola, y predominantemente bajo siembra directa, asociado a un incremento en el uso del glifosato, herbicida no selectivo de amplio espectro. Esta práctica puede impactar sobre el estado sanitario de los cultivos, dado que el uso del glifosato combinado con el manejo de suelo deja el rastrojo en superficie, generando un microclima favorable o adverso al desarrollo de enfermedades, en función de su efecto sobre las comunidades microbianas del suelo y rastrojo. Este trabajo tiene como objetivo general contribuir al conocimiento del efecto de la intensificación agrícola sobre los microorganismos del suelo; específicamente busca cuantificar el impacto de la molécula de glifosato sobre algunas comunidades microbianas patógenas y benéficas del suelo y rastrojo. Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar el efecto de dosis crecientes de diferentes moléculas de glifosato (ingrediente activo) sobre el crecimiento microbiano de especies benéficas (*Trichoderma harzianum*, *T. atroviride* y *Pseudomonas fluorescens*) y de especies patógenas (*Fusarium solani sensu lato*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *Pythium debaryanum*). Se estudió *in vitro* el efecto de la molécula ácida sobre la producción de peritecios (estructura de inóculo primario de la Fusariosis de la Espiga) de una cepa de *F. graminearum* patogénica en rastrojo de trigo. Se realizaron ensayos maceteros en invernáculo para evaluar el efecto de dosis crecientes de glifosato ácido sobre la densidad de poblaciones microbianas presentes en suelo con distinta intensidad de uso, secuencia de cultivos y frecuencia de aplicaciones de glifosato. El crecimiento microbiano de especies patógenas se redujo al aumentar las dosis de las tres moléculas de glifosato, siendo la sal de isopropilamina la que causó mayor efecto. *Fusarium graminearum* fue la especie patógena más afectada, seguida por *Pythium debaryanum*. *F. solani* fue la especie menos afectada, mientras que los aislados de *F. oxysporum* mostraron una respuesta intermedia. El crecimiento microbiano de especies benéficas también se redujo al aumentar las dosis de glifosato. La cepa de *T. harzianum* presentó mayor sensibilidad frente al glifosato respecto de *T. atroviride*. Sólo la sal de isopropilamina redujo significativamente las UFC de *Pseudomonas fluorescens*. En los cultivos duales, dosis crecientes de glifosato afectaron las interacciones entre microorganismos, favoreciéndose el patógeno en detrimento del antagonista. Tanto el ensayo sobre rastrojos de trigo como los ensayos maceteros no discriminaron efectos de dosis crecientes de la molécula ácida de glifosato. Se discute la necesidad de analizar los efectos del uso de glifosato sobre microorganismos patógenos y benéficos, así como sobre su interacción, para estimar la resultante sobre el estado sanitario de los cultivos y definir estrategias de manejo.

Palabras clave: Sustentabilidad, Herbicidas, Rastrojo, Siembra directa, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* fluorescentes.

ÍNDICE

Tabla de contenidos	Página
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>1.1. Sistemas de producción agropecuarios del Uruguay</u>	1
<u>1.2. El herbicida glifosato en la agricultura</u>	2
<u>1.3. Comunidades microbianas y calidad de suelo</u>	5
<u>1.4. Comunidades microbianas y estado sanitario de los cultivos</u>	6
1.4.1. Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> spp.	7
1.4.2. Enfermedades causadas por <i>Pythium</i> spp.	9
1.4.3. Control biológico de fitopatógenos del suelo	9
1.4.3.1. Hongos antagonistas: <i>Trichoderma</i> spp.	10
1.4.3.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	11
1.4.4. Factores determinantes del desarrollo de la enfermedad	12
<u>1.5. Efectos del glifosato sobre las comunidades microbianas edáficas</u>	13
<u>1.6. Justificación del trabajo</u>	14
<u>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	15
<u>2.1. Objetivos</u>	15
2.1.1. Objetivo general	15
2.1.2. Objetivos específicos	15
<u>2.2. Estrategia de trabajo</u>	15
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	16
<u>3.1. Moléculas de glifosato</u>	16
<u>3.2. Aislados microbianos</u>	17
<u>3.3. Ensayos <i>in vitro</i></u>	17
3.3.1. Cultivos puros	17
3.3.1.1. Microorganismos patógenos	17
3.3.1.2. Microorganismos benéficos	18
3.3.1.3. Análisis estadístico	18
3.3.2. Cultivos duales	19
3.3.2.1. Cultivo dual <i>Fusarium</i> spp. – <i>Trichoderma</i> spp.	19
3.3.2.2. Cultivo dual <i>Pythium debaryanum</i> - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	19
3.3.2.3. Análisis estadístico	20

<u>3.4. Ensayo de <i>Fusarium graminearum</i> en rastrojo de trigo</u>	20
3.4.1. Análisis estadístico	21
<u>3.5. Ensayos en invernáculo</u>	21
3.5.1. Muestreo y análisis de suelo	21
3.5.2. Ensayo macetero	22
3.5.2.1. Preparación de macetas	22
3.5.2.2. Siembra e incorporación de avena	22
3.5.2.3. Aplicación de tratamientos	22
3.5.2.4. Determinación de poblaciones microbianas	23
3.5.3. Análisis estadístico	24
<u>4. RESULTADOS</u>	25
<u>4.1. Ensayo <i>in vitro</i> de cultivos puros</u>	25
4.1.1. Microorganismos patógenos	25
4.1.2. Ensayo <i>in vitro</i> de cultivos puros benéficos	35
4.1.2.1. <i>Trichoderma</i> spp.	35
4.1.2.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	38
<u>4.2. Ensayo <i>in vitro</i> de cultivos duales</u>	39
4.2.1. <i>Fusarium</i> spp. – <i>Trichoderma</i> spp.	39
4.2.2. <i>Pythium debaryanum</i> – <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42
<u>4.3. Efecto de dosis crecientes de glifosato ácido sobre la cantidad y madurez de peritecios de <i>Gibberella zeae</i>/<i>Fusarium graminearum</i> en rastrojo de trigo</u>	44
<u>4.4. Ensayos maceteros</u>	46
4.4.1. Descripción de las parcelas analizadas	46
4.4.1.1. Análisis de las propiedades físico – químicas	46
4.4.1.2. Análisis de residuos	46
4.4.1.3. Análisis microbiológico	46
4.4.2. Ensayo macetero en invernáculo	46
<u>5. DISCUSIÓN</u>	48
<u>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	54
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	55

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO N°	Página
1: Relación entre Volumen inicial y Concentración final deseada de las moléculas evaluadas.	16
2: Características de los aislados evaluados.	17
3: Significancia del efecto de la molécula y la dosis en el crecimiento de microorganismos patógenos analizado como ADC, según ANOVA.	25
4: Significancia del efecto de la dosis de cada molécula de glifosato en el crecimiento de microorganismos patógenos analizado como ADC, según ANOVA.	32
5: Significancia del efecto de la molécula y la dosis en el crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>T. harzianum</i> analizado como ADC, según ANOVA.	35
6: Significancia del efecto de la dosis de cada molécula de glifosato en el crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>T. harzianum</i> analizado como ADC, según ANOVA.	37
7: Efecto de las dosis de cada molécula sobre el crecimiento de dos aislados de <i>Trichoderma</i> spp. en cultivos duales con tres aislados de <i>Fusarium</i> spp.	39
8: Significancia del efecto de la molécula y la dosis en la inhibición entre <i>Pythium debaryanum</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	43
9: Resultados de análisis de las propiedades físico – químicas de los tratamientos CC y ROT.	46
10: Densidad poblacional microbiana inicial en la parcela bajo cultivo continuo y bajo rotación con pasturas.	46
11: Significancia del suelo y la dosis en la densidad poblacional de los microorganismos estudiados, analizada como ADC, según ANOVA.	47
FIGURA N°	Página
1: Estructura química del glifosato.	3
2: Fórmula química de sal de isopropilamina de glifosato.	4
3: Fórmula química de sal de potasio de glifosato.	4
4: Factores principales que determinan la disponibilidad de nutrientes y desarrollo de enfermedad en las plantas.	7

5: Crecimiento <i>in vitro</i> del aislado de <i>Fusarium solani</i> según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato.	26
6: Crecimiento <i>in vitro</i> del aislado de <i>Fusarium graminearum</i> según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato.	27
7: Efecto del agregado de dosis crecientes de glifosato ácido sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de a) <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> , b) <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> resistente a Benomyl y c) <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> .	28
8: Efecto del agregado de dosis crecientes de glifosato como sal de potasio sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de a) <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> , b) <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> resistente a Benomyl y c) <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> .	29
9: Efecto del agregado de dosis crecientes de glifosato como sal de isopropilamina sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de a) <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> , b) <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> resistente a Benomyl y c) <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> .	30
10: Crecimiento <i>in vitro</i> del aislado de <i>Pythium debaryanum</i> según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato.	31
11: Crecimiento de <i>Pythium debaryanum</i> según diferentes dosis de sal de isopropilamina.	31
12: Área debajo de la curva del aislado <i>Fusarium graminearum</i> en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato.	33
13: Área debajo de la curva del aislado <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato.	33
14: Área debajo de la curva del aislado <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato.	34
15: Área debajo de la curva del aislado <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> resistente a Benomyl en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato.	34
16: Área debajo de la curva del aislado <i>Pythium debaryanum</i> en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato.	35
17: Crecimiento <i>in vitro</i> de aislados de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>T. atroviride</i> según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato.	36
18: Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> según diferentes concentraciones de sal de isopropilamina.	37
19: Área debajo de la curva de <i>Trichoderma</i> spp. en función de dosis	

crecientes de la sal de isopropilamina.	38
20: Unidades formadoras de colonias de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato.	38
21: Área de crecimiento de los antagonistas <i>Trichoderma atroviride</i> (a) y <i>T. harzianum</i> (b) testados en cultivos duales con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> resistente a benomyl, en función de dosis crecientes de sal de isopropilamina.	40
22: Área de crecimiento de los antagonistas <i>Trichoderma atroviride</i> (a) y <i>T. harzianum</i> (b) testados en cultivos duales con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> , en función de dosis crecientes de sal de isopropilamina.	40
23: Área de crecimiento de los antagonistas <i>Trichoderma atroviride</i> (a) y <i>T. harzianum</i> (b) testados en cultivos duales con <i>Fusarium solani</i> , en función de dosis crecientes de sal de isopropilamina.	41
24: Cultivo dual a) <i>Trichoderma atroviride</i> y b) <i>T. harzianum</i> vs <i>Fusarium solani</i> según dosis crecientes de sal de isopropilamina.	41
25: Relación de crecimiento del antagonista vs. el patógeno para la concentración máxima de 140 ppm de sal de isopropilamina vs. testigo sin glifosato.	42
26: Cultivo dual <i>Pythium debaryanum</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> según tratamiento testigo y tratamiento con dosis de 140 ppm de glifosato como ácido.	43
27: Interacción entre <i>Pythium debaryanum</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> según dosis crecientes de sal de potasio.	44
28: Distribución de frecuencia de estados de madurez de <i>G. zaeae</i> / <i>F. graminearum</i> , en tres momentos a) 30 días, b) 60 días y c) 90 días luego de aplicados los tratamientos.	45

ANEXOS	Página
I – Lista de formulados comerciales de glifosato	64
II – Cálculos	66
III – Medios de cultivo	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas de producción agropecuarios del Uruguay

Desde el año 2000 se ha dado una importante intensificación y especialización del sector agrícola, principalmente en el litoral del país, con un aumento del área sembrada del cultivo de soja que hoy supera las 800 mil hectáreas (MGAP-DIEA, 2010). También el sector hortícola en el sur del país, se caracteriza por sistemas de producción con un uso de la tierra extremadamente intensivo (Dogliotti, 2003). Desde el punto de vista ambiental, los procesos de intensificación conducen a la degradación de los recursos naturales, entre ellos la biodiversidad, el agua y el suelo. En el suelo se producen incrementos en la erosión, disminución en el contenido de materia orgánica, cambios en la estructura, disminución en la capacidad de retención de agua, aumentos en la incidencia de malezas, insectos y enfermedades (Andow, 1991; Altieri, 1999; Abawi y Widmer, 2000). Esto plantea interrogantes sobre la sustentabilidad social, económica y ambiental de estos sistemas de producción en amplias zonas del país en el mediano y largo plazo (Altieri y Nichols, 2005).

En Uruguay, desde las etapas iniciales del desarrollo de la agricultura hasta fines de la década de 1950, los sistemas de producción se caracterizaban por la siembra continua de cultivos, con laboreos convencionales, sin técnicas para el control de la erosión. Esto condujo al deterioro de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Morón, 2003).

Posteriormente, en la década de 1960, comienza la inclusión de praderas (gramíneas y leguminosas). El sistema agropecuario dominante en el litoral del país pasó a caracterizarse por la práctica de rotaciones entre cultivos anuales y praderas pluri-anales. Estos sistemas mixtos, a través de la diversificación, resultan en una mayor estabilidad de la producción, mejoran la sanidad de los cultivos y favorecen la conservación del suelo. Las rotaciones con pasturas contribuyen a la sostenibilidad porque tienen la capacidad de revertir los procesos de degradación de los suelos, recuperando potencial productivo (Díaz, 2003).

A pesar de las ventajas de estos sistemas, recientemente la especialización del sector se ha visto favorecida por un aumento en la rentabilidad de los cultivos y por la adopción de la tecnología de producción bajo siembra directa. Las demandas cada vez más exigentes del mercado mundial en el ámbito de la producción agrícola, han llevado a un uso exhaustivo de la tierra. En este contexto, se produjo una rápida sustitución del sistema mixto por uno exclusivamente agrícola, basado en una secuencia de cultivos de verano e invierno con mayor proporción de cultivos oleaginosos en relación a los cerealeros (Díaz, 2003; Durán y García Préchac, 2007).

La tecnología de siembra directa es considerada una práctica conservacionista ya que minimiza la erosión y degradación al no laborear el suelo; disminuye el impacto de la lluvia, protege el suelo de la compactación superficial y la ruptura de los agregados, y minimiza el escurrimiento superficial, aumentando la capacidad de infiltración del agua. La presencia de rastrojo reduce la amplitud térmica en la parte superficial del suelo, tornando las condiciones más favorables para las comunidades bióticas. A su vez, reduce la evaporación directa de la superficie del suelo, permite un reciclaje de lenta liberación de nutrientes y aumenta el tenor de materia orgánica en el perfil del suelo

(García Préchac, 2003). Sin embargo, esta tecnología intensifica el uso de herbicidas como el glifosato (Johal y Huber, 2009). Usualmente el cultivo de soja recibe entre tres y cinco aplicaciones de glifosato (Blum *et al.*, 2008).

Asimismo, dicha práctica puede impactar sobre el manejo sanitario de los cultivos. El rastreo en superficie, modifica la temperatura y la humedad en los primeros centímetros de suelo, y como consecuencia, puede ejercer un efecto directo sobre la fracción viva del suelo, generando un microclima favorable o adverso al desarrollo de enfermedades, en función de su efecto sobre las comunidades microbianas patógenas y benéficas (Altman y Campbell, 1977; Duncan y Paxton, 1981). Los cambios tecnológicos ocurridos en el sistema de producción agrícola del país han tenido un efecto diferencial sobre las principales enfermedades de los cultivos (Pérez y Villar, 2011). La intensificación de la producción agrícola junto con la reducida lista de cultivos aptos para las condiciones de Uruguay, han afectado la dinámica de los patógenos en dichos sistemas. La problemática sanitaria resurgió cuando la producción de granos comenzó a tener mayor competitividad que otros rubros y las propiedades físico-químicas del suelo en sistemas sin laboreo comenzaron a evidenciar una cierta independencia de la fase pastura (García-Préchac *et al.*, 2004).

En la zafra 2009/2010 el área agrícola estuvo dominada por el cultivo de soja en el verano y el cultivo de trigo en invierno con aproximadamente 860.000 hectáreas de soja (83% del área total de cultivos de verano) y 553.000 hectáreas de trigo (76% del área total de cultivos de invierno) (Pérez y Villar, 2011). Dicha situación genera incertidumbre en relación a la sustentabilidad productiva y ambiental en el mediano y largo plazo (Díaz *et al.*, 2004), entre otras razones, por la ocurrencia de una disminución de la biodiversidad asociada a incrementos en el uso de agroquímicos para el control de plagas, enfermedades y malezas (Altier, 2003; Ríos, 2004; Stewart *et al.*, 2004; Zerbino, 2004).

Por otro lado, la intensificación en la horticultura ha provocado un desequilibrio en la organización de los establecimientos hortícolas, resultando en un uso ineficiente de los recursos productivos, pérdida de biodiversidad, mayor dependencia de insumos externos y un mayor impacto sobre el ambiente (Chiappe, 1995; Evia y Gudynas, 2000; Dogliotti, 2003).

1.2. El herbicida glifosato en la agricultura

Dada su asociación al cultivo de soja el uso de glifosato ha tenido un crecimiento explosivo en los últimos años, registrándose en el año 2010 la importación de aproximadamente 9000 toneladas de sustancia activa (MGAP - DGSA, 2010). De acuerdo al Instituto Nacional de Semillas (INASE) el 100% de la soja que se siembra en Uruguay es soja RR (*Roundup Ready*®), la cual presenta la inserción de un gen que le confiere resistencia al herbicida a base de glifosato (Franz *et al.*, 1997). Durante el 2010, el glifosato representó el 85% de todos los herbicidas importados al país (MGAP - DGSA, 2010).

El glifosato es un derivado del aminoácido glicina, con ácido fosfónico unido al grupo amino, (N-fosfometilglicina) siendo su fórmula $C_3H_8NO_5P$ (Araújo *et al.*, 2003; Duke *et al.*, 2003a; Meriles *et al.*, 2006) (Figura 1). Se transloca de forma simplástica desde las hojas a las raíces. Actúa inhibiendo a la enzima 3-enolpiruvil-siquimato-5-

fosfato sintetasa (EPSPS), clave en la vía biosintética del ácido shikímico; bloquea la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales precursores de otros compuestos aromáticos críticos, incluyendo reguladores de crecimiento y fitoalexinas, suprimiendo los mecanismos de defensa contra patógenos (Duke *et al.*, 2003a). Los productos relevantes de la vía del ácido shikímico son tres aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina y fenilalanina (Franz *et al.*, 1997; Fischer, 2008). Johal y Huber (2009) citan su acción como quelatante del manganeso, que es un cofactor de la enzima EPSPS. La ruta del ácido shikímico no existe en animales, sí ocurre en plantas (Busse *et al.*, 2001) y está presente en los microorganismos (Bentley, 1990).

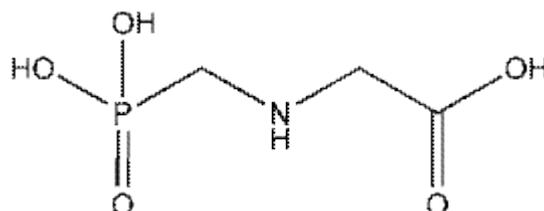


Figura 1. Estructura química del glifosato
(http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp)

La degradación microbiana es considerada el proceso de transformación más importante que determina la persistencia de herbicidas en el suelo. En el caso del glifosato, el principal producto de degradación es el ácido aminometilfosfónico (AMPA) y en menor grado el glioxilato. Finalmente conduce a la producción de agua, dióxido de carbono y fosfato según Franz *et al.* (1997) y Forlani *et al.* (1999). El AMPA es comúnmente detectado en suelos sometidos a frecuentes aplicaciones de glifosato (Fomsgaard *et al.*, 2003).

El principio activo (glifosato) consiste en una molécula ácida. En el inicio del proceso industrial dicha molécula es neutralizada transformándose en sales, como ser la sal de isopropilamina (Figura 2) o la sal de potasio (Figura 3). Esta última es una sustancia extremadamente cáustica que puede afectar las membranas mucosas y tejidos del tracto respiratorio superior (Pazos, 2008). Estas sales son la base inicial para la obtención de los diferentes formulados comerciales. Estos contienen coadyuvantes que facilitan su manipulación y mejoran su aplicación. Muchos formulados contienen el surfactante polioxietileno-amina (POEA), que altera o interrumpe la respiración de los organismos acuáticos. Estudios recientes han demostrado que el POEA es extremadamente tóxico para los organismos acuáticos (Bozzo, 2010). En el Anexo 1, se presenta una lista de la diversidad de formulados comerciales según los diferentes principios activos existentes en el mercado (tomado de guía sata: <http://laguiasata.com/joomla/>).

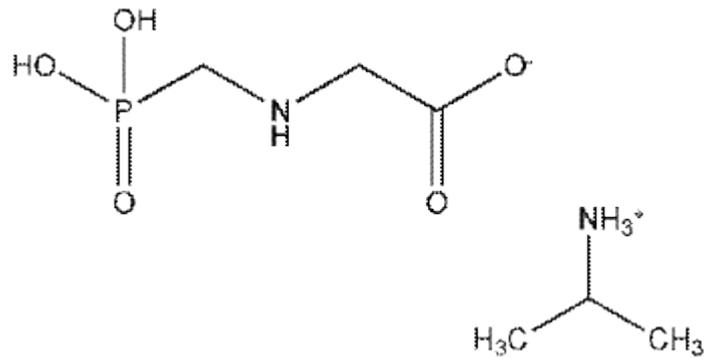


Figura 2. Fórmula química de sal de isopropilamina de glifosato

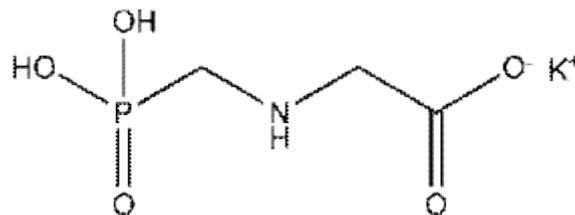


Figura 3. Fórmula química de sal de potasio de glifosato

El glifosato se absorbe por las hojas de las plantas, es transportado sistémicamente hacia las raíces y eventualmente es liberado hacia la rizósfera (Coupland and Casely, 1979). El glifosato es degradado a través de la planta en mínimas cantidades (Arregui *et al.*, 2003) y la mayoría se trasloca a las fosas metabólicamente activas, incluyendo las semillas (Duke *et al.*, 2003b), los nódulos (Reddy and Zablotowicz, 2003), y las raíces (Duke, 1996). A su vez, Neumann *et al.* (2006) demostraron que el glifosato es liberado por las raíces de las plantas que están muriendo y transferido a plantas sanas a través de la absorción radicular.

El glifosato tiene escasa o nula actividad en el suelo dado el rápido potencial de adsorción por parte de las partículas orgánicas e inorgánicas del mismo (Duke y Powles, 2008). En contraste, muchos estudios muestran que el glifosato está disponible como sustrato para las comunidades microbianas en el suelo y en la rizósfera, permitiendo aumentar la biomasa y la actividad microbiana (Wardle y Parkinson, 1990b; Haney *et al.*, 2000).

Los suelos arcillosos adsorben más el glifosato y el AMPA que los suelos arenosos, quedando menos expuestos a la degradación microbiana, aunque dicha adsorción no es permanente (Araujo *et al.*, 2003). A su vez, Simonsen *et al.* (2008) han demostrado que suelos con agregado de fertilizantes fosfatados aumentan la cantidad de glifosato disponible, dado que los sitios de adsorción están ocupados por iones fosfatos. Por lo tanto, el glifosato que queda en la solución del suelo puede ser absorbido por las raíces de las plantas, ser metabolizado por los microorganismos o alcanzar aguas subsuperficiales.

Araujo *et al.* (2003) señalan que la presencia de glifosato en suelos puede causar cambios en la población y en la actividad microbiana del mismo. Diversos estudios señalan su efecto tanto sobre los microorganismos que intervienen en los ciclos de

nutrientes como sobre aquellos que determinan el estado sanitario de los cultivos (Altman y Campbell, 1977; Mekwatanakarn y Sivasithamparam, 1987; Hornby *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2007).

1.3. Comunidades microbianas y calidad de suelo

La salud de los suelos es medida por su capacidad de realizar funciones de sustentación de la biodiversidad presente, de regulación de los flujos de agua y solutos, de degradación, inmovilización y detoxificación de compuestos orgánicos e inorgánicos, y de ciclado de nutrientes y otros elementos. Doran *et al.* (1996) definen la calidad de suelo como la capacidad de sostener algunas de las funciones ecológicas claves para los ecosistemas.

El mantenimiento de la productividad del ecosistema depende principalmente de la transformación de la materia orgánica, y consecuentemente de la biomasa microbiana del suelo (Valpassos *et al.*, 2001). Según Smith y Paul (1990) la materia orgánica constituye una de las más importantes fuentes de energía y nutrientes para el desarrollo de los microorganismos. Si bien la biomasa microbiana corresponde a menos del 1% del total de biomasa edáfica, cumple un rol fundamental en el ecosistema del suelo (Frioni, 2006).

Los microorganismos están involucrados en todos los procesos edáficos claves. Contribuyen a la agregación de las partículas del suelo y participan en los procesos de formación del mismo, intervienen en la descomposición y transformación de la materia orgánica y en la remoción de xenobióticos, actúan directamente en los ciclos de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, y regulan el pool de nutrientes disponibles para las plantas. Tienen efecto sobre el estado nutricional y sanitario de las plantas, mediante la promoción de crecimiento vegetal y la supresión de enfermedades causadas por patógenos del suelo (Anderson y Domsch, 1980; Jenkinson y Ladd, 1981; Stevenson, 1986; Pankhurst y Lynch, 1994; Pankhurst, 1997; Frioni, 2006).

En un sistema edáfico estable, los componentes de la fase sólida del suelo -arena, limo, arcilla y materia orgánica- proporcionan los nichos ocupados por aquellos microorganismos que fueron capaces de colonizarlos y establecerse. De esta forma, en cada ecosistema el colectivo de microorganismos (composición y estructura de las comunidades) es el catalizador de los procesos bioquímicos del suelo (función de las comunidades). Cambios en la estructura de las comunidades microbianas pueden llevar a cambios en importantes funciones, como por ejemplo la descomposición de la materia orgánica y degradación de xenobióticos (MacAlady *et al.*, 1998).

La diversidad en la composición y estructura de las comunidades microbianas es determinante en la prestación de servicios esenciales y, por tanto, tiene un efecto directo sobre la función ecológica y la capacidad de resiliencia frente a los disturbios ecosistémicos (van Elsas *et al.*, 2002). Por esta razón, la magnitud de la diversidad microbiana es crítica para el mantenimiento de la salud y calidad del suelo (Doran *et al.*, 1996).

Existen tres factores principales e interrelacionados que básicamente definen los atributos de las comunidades microbianas edáficas: el tipo de suelo, la planta, y el manejo de ambos, suelo y planta (Garbeva *et al.*, 2004). La estructura, textura, materia

orgánica (M.O.), pH, y nutrientes del suelo determinan los nichos habitables para los microorganismos. Las plantas constituyen la fuente de carbono y energía, mientras que las prácticas agronómicas como rotación de cultivos, laboreo, uso de plaguicidas, riego y pastoreo modifican y regulan las interacciones que se dan entre los componentes bióticos y abióticos del sistema.

Para evaluar la calidad del suelo no sólo es importante cuantificar la condición del mismo en un momento dado, sino también el efecto del manejo en el tiempo sobre los fenómenos que la pueden afectar en mayor medida como son la erosión, la infiltración, la compactación, la estabilidad estructural, la pérdida de nutrientes y materia orgánica, y la actividad biológica (Terra y García Préchac, 2001). La evaluación de la calidad de suelo es realizada por indicadores físicos, químicos y biológicos. Dentro de estos últimos, los indicadores microbiológicos tienen una gran importancia y están basados en la diversidad y densidad de la población de bacterias y hongos (Sicardi *et al.* 2005). Se ha propuesto el desarrollo de indicadores microbiológicos de calidad de suelo, capaces de detectar el efecto de los cambios de uso y manejo (van Bruggen y Semenov, 2000; Sicardi *et al.*, 2004; 2005; Monteiro, 2005).

En este marco, los agroquímicos utilizados en la agricultura tienen la potencialidad de afectar las poblaciones microbianas del suelo. En el caso del glifosato, diversos autores mencionan que este herbicida es tóxico para muchos microorganismos edáficos, bacterias y hongos (Wardle y Parkinson, 1992; Busse *et al.*, 2001). El efecto neto del glifosato parece causar una alteración en la composición de las comunidades microbianas del suelo y raíces, ya que selectivamente puede estimular componentes de la comunidad microbiana en detrimento de otras. En función de su rápida respuesta a la disponibilidad de contaminantes, diversos microorganismos han sido ampliamente usados en estudios de salud ecológica (Wardle y Parkinson, 1992; Busse *et al.*, 2001).

1.4. Comunidades microbianas y estado sanitario de los cultivos

De acuerdo al concepto más clásico del triángulo de las enfermedades en las plantas, el desarrollo de las mismas es el resultado de la combinación de tres componentes básicos: plantas susceptibles, patógeno virulento y condiciones ambientales favorables por un período de tiempo determinado (Agrios, 2005).

Más recientemente se argumenta la coexistencia en la naturaleza de cuatro factores primarios que determinan una adecuada nutrición y salud de las plantas (Figura 4). En primer lugar la capacidad de crecimiento y resistencia de la propia planta a enfermarse y su habilidad para obtener los nutrientes necesarios. En segundo lugar la virulencia y cantidad de microorganismos patógenos que estén a su alrededor; en tercer lugar, los microorganismos benéficos, antagonistas, que se encuentran en la rizósfera actuando como controladores biológicos. El último componente, aunque no menos importante, lo determinan las condiciones abióticas ambientales (temperatura, humedad), así como las edáficas (propiedades físico-químicas del suelo, textura, pH, disponibilidad de nutrientes). Las prácticas agronómicas pueden impactar en cualquiera de estos factores, determinando un desequilibrio en el rombo descrito, lo que puede desencadenar el desarrollo de enfermedad en las plantas con la consiguiente pérdida de rendimiento y calidad (Garbeva *et al.*, 2004; Johal y Huber, 2009).

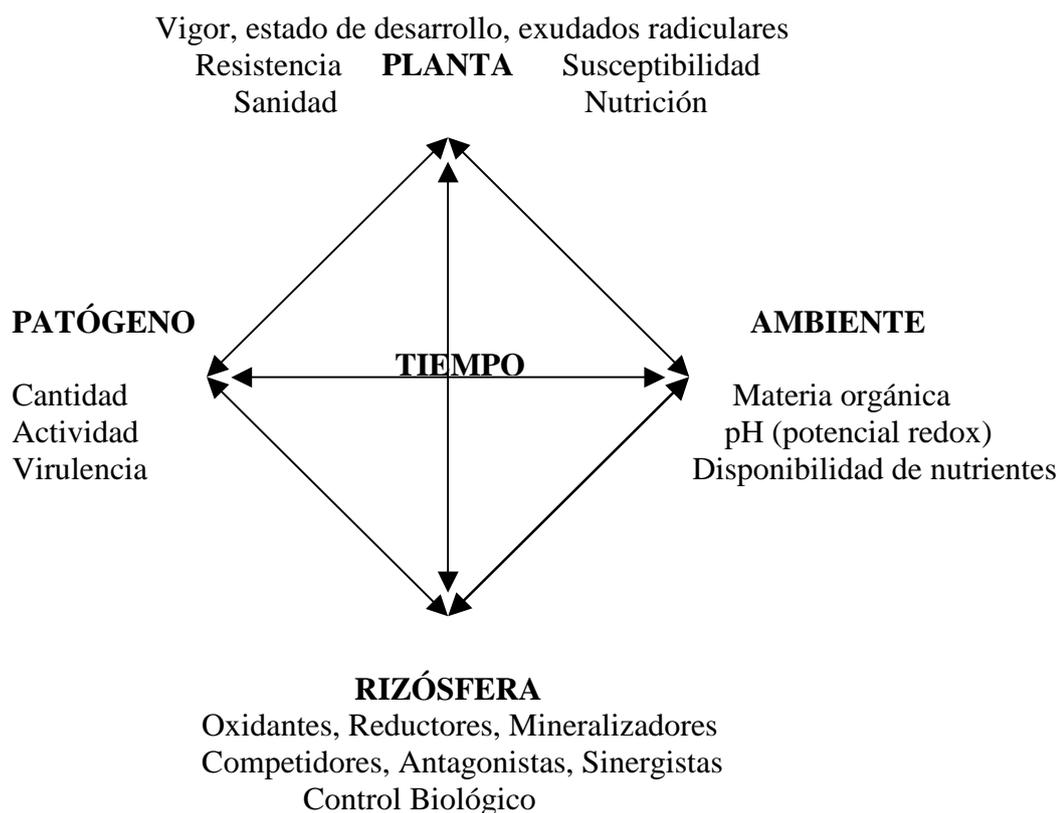


Figura 4. Factores principales que determinan la disponibilidad de nutrientes y desarrollo de enfermedad en las plantas (modificado de Johal y Huber, 2009).

1.4.1. Enfermedades causadas por *Fusarium* spp.

Diversas especies del género *Fusarium* son habitantes naturales de los suelos del Uruguay y son capaces de causar enfermedad en cultivos cerealeros, leguminosas y hortalizas. Diversas especies de *Fusarium* son agentes causales de importantes enfermedades, como la podredumbre de corona y raíz (Fernandez y Jefferson, 2004) y la fusariosis de la espiga (FE) en cereales. En nuestro país, especialmente esta última enfermedad es de gran importancia. En las dos últimas décadas, la FE ha aumentado su frecuencia de aparición y severidad, pasando a ser uno de los factores principales de reducción de rendimiento y calidad de trigo y cebada en varias regiones de producción (Díaz de Ackermann y Pereyra, 2010).

De las especies de *Fusarium* que pueden ocasionar FE, la más importante es *F. graminearum* Schwabe (teleomorph *Gibberella zea* [Schwein.] Petch) (Pritsch, 1995; Pereyra, 2005; Pereyra *et al.*, 2006). Este patógeno produce micotoxinas de alto riesgo tanto para humanos como para el ganado. La micotoxina más comúnmente encontrada en granos infectados es deoxinivalenol (DON). La tecnología de siembra directa deja en superficie un volumen importante de rastrojo al momento de la cosecha, lo cual permite la supervivencia del hongo principalmente formando estructuras como los peritecios, donde se producen ascosporas, inóculo primario para la enfermedad (Díaz de Ackermann y Pereyra, 2010).

En nuestro país, *F. graminearum* es capaz de sobrevivir en rastrojo infectado de trigo, cebada, maíz, sorgo, moha, avena y algunas otras gramíneas componentes de las pasturas o malezas. En estudios epidemiológicos realizados en distintas secuencias de cultivos se ha determinado que en nuestras condiciones, trigo y cebada y en menor grado maíz son los rastrojos con mayor colonización y que a su vez aportan la mayor cantidad de inóculo de *F. graminearum*. Los rastrojos de trigo y cebada en superficie pueden aportar inóculo por un período de 2 a 2.5 años post-cosecha, mientras que si son enterrados aportan inóculo por 1 a 1.5 años. Si bien la supervivencia de *F. graminearum* en el rastrojo de maíz es prolongada, pudiendo llegar hasta 4 años, el aporte de inóculo del rastrojo de maíz en superficie ha sido medido hasta 3 años post-cosecha, pero en muy bajos niveles (Díaz de Ackermann y Pereyra, 2010).

Las enfermedades del sistema radicular y estolones de las leguminosas son causadas por un complejo de patógenos del suelo, siendo *Fusarium* el principal género asociado (Altier, 2003). Por lo general, estos microorganismos muestran una alta capacidad de competencia saprofítica y presentan mecanismos alternativos y eficientes de supervivencia, que constituyen las fuentes de inóculo para la infección inicial. En su mayoría inducen la ocurrencia de enfermedades monocíclicas, pues los organismos causales cumplen un solo ciclo de infección por estación de crecimiento (Altier, 2010).

Infecciones crónicas causadas por *Fusarium* spp., principalmente *F. oxysporum* y *F. solani* causan podredumbre de raíz y corona en diversas leguminosas y reducen la capacidad de absorción de agua y nutrientes, de anclaje, de fijación de nitrógeno y de almacenamiento de reservas, ocasionando la muerte de plantas o disminuyendo su vigor (Altier, 2003; Leslie y Summerell, 2006; Altier, 2010). Estos patógenos pueden penetrar a los tejidos vegetales directamente, pero en su mayoría presentan baja capacidad para iniciar el proceso de infección. La ocurrencia de heridas en los tejidos, como resultado del daño por insectos, maquinaria o pisoteo animal, actúa como puerta de entrada para la infección subsecuente. Una vez que la infección tiene lugar, el micelio del hongo se desarrolla en los tejidos epidérmicos, colonizando posteriormente la corteza y endodermis. *Fusarium oxysporum* tiene una alta capacidad de competencia saprofítica. Utiliza un amplio rango de huéspedes y sustratos, y es capaz de sobrevivir a través de la formación de clamidosporas (Banchero, 2003).

Fusarium solani tiene una distribución cosmopolita, pudiéndose encontrar en numerosos suelos. Es patógeno de un amplio rango de huéspedes, entre los que se destacan las leguminosas, incluida la soja. Entre las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en soja se destaca el síndrome de muerte súbita (Sudden Death Syndrome, SDS), causado *F. solani* pv. *glycines*. (Leslie y Summerell, 2006) y reclasificado como cuatro especies distintas dentro de *F. solani sensu lato*: *F. virguliforme* (Aoki *et al.*, 2003); *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* y *Fusarium* sp. (O'Donnell *et al.*, 2010).

En el cultivo de frutilla especies del género *Fusarium*, particularmente *F. oxysporum*, determinan la enfermedad denominada “raíces negras”. La misma causa destrucción de las raíces absorbentes, pudrición y ennegrecimiento del sistema radicular, con la consiguiente reducción del vigor y rendimiento, ocasionando muerte de las plantas. Esta enfermedad adquiere importancia en cultivos intensivos, que no incluyen estrategias de mejora del suelo (Maas, 1998; Leoni, 2003). En el cultivo de cebolla el patógeno

Fusarium oxysporum f.sp. *cepae* causa podredumbre radicular y marchitamiento de planta (Schwartz y Mohan, 2008).

1.4.2. Enfermedades causadas por *Pythium* spp.

El género *Pythium* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y muchas especies causan importantes pérdidas económicas en la agricultura (Altier y Thies, 1995). *Pythium* pertenece al reino Chromista (Stramenopiles), familia Pythiaceae, orden Peronosporales y clase Oomycetes.

Condiciones ambientales de baja temperatura y alta humedad del suelo, como las que se generan en un sistema bajo siembra directa, con presencia de rastrojo en superficie, son altamente favorables al desarrollo de enfermedades de implantación (damping-off), podredumbre de corona y podredumbre negra de raíz, causadas por especies del género *Pythium*, entre otras. Esto determina una baja tasa de germinación, reduce la emergencia de plántulas y limita el establecimiento de los cultivos post emergencia (Altier y Thies, 1995; Martín y Loper, 1999; Altier, 2010; Pérez *et al.*, 2010). Si bien este grupo de patógenos puede causar infecciones en un amplio rango de temperaturas de suelo (Altier y Thies, 1995), bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas de las plántulas dilatando el período entre germinación de la semilla y lignificación de tejidos, aumentando por consiguiente el período de susceptibilidad a los mismos. A su vez, la presencia de alta humedad en el suelo favorece la diseminación del patógeno en el mismo, ya que las zoosporas producidas por estas especies patogénicas pueden desplazarse en las películas de agua en el suelo y llegar a la superficie de la plántula para causar la infección (Pérez *et al.*, 2010).

Pythium es considerado patógeno oportunista dado que la enfermedad se observa en plantas jóvenes y débiles. Bajo condiciones ideales, en proximidad a las semillas se produce una rápida germinación de las esporas de resistencia y crecimiento del patógeno, en respuesta al exudado de nutrientes seminales. La infección puede ocurrir a pocas horas de haber sido sembrada la semilla (Ellis *et al.*, 1999). *Pythium* spp. tienen la habilidad de penetrar por los pelos absorbentes durante todo el ciclo de vida de las plantas. Sin embargo, el impacto sobre la supervivencia de las plántulas es mayormente en los primeros días de vida de las mismas, ya que en estados más avanzados se da un proceso de compensación donde los pelos absorbentes infectados pueden morir sin afectar significativamente la fisiología de la plántula (Pérez *et al.*, 2010). *Pythium* spp. poseen una pobre habilidad competitiva por lo cual actúa en general como colonizador primario. Esta característica presente en las especies fitopatógenas posibilita el desarrollo de sistemas de biocontrol eficientes (Hultberg *et al.*, 2000).

1.4.3. Control biológico de fitopatógenos del suelo

Se define al control biológico como la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del huésped o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas (Baker y Cook, 1974).

Existe un biocontrol natural en los llamados suelos supresivos, que son aquellos donde los hongos fitopatógenos son incapaces de persistir, o estando presentes no alcanzan a

inducir síntomas severos de enfermedad en el cultivo susceptible. Este fenómeno ha sido bien caracterizado llegándose a la conclusión que la supresión es el resultado de la presencia de ciertas rizobacterias con actividad antifúngica (Weller *et al.*, 2002). Se ha demostrado que algunas cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de antibióticos son frecuentemente aisladas de estos suelos (Raaijmakers *et al.*, 1997). Los microorganismos rizosféricos, entre ellos *P. fluorescens*, son muy adecuados como agentes de control biológico de enfermedades de raíz dado que se ubican en estrecha asociación con las raíces, conformando una barrera contra los patógenos (Mondino y Vero, 2006).

A su vez se ha demostrado el importante rol de diversos hongos del suelo con propiedades antagonicas frente a organismos fitopatógenos. Tal es el caso de cepas de *Fusarium* spp. no patógenos en la supresión de las enfermedades vasculares causadas por cepas patógenas de *Fusarium* spp. (Mazzola, 2002), y de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. (Pérez *et al.*, 2011).

1.4.3.1. Hongos antagonistas: *Trichoderma* spp.

Los hongos del género *Trichoderma* son habitantes naturales de los suelos a nivel mundial y han mostrado tener una gran capacidad antagonica frente a un variado grupo de patógenos (Wells, 1988). En general *Trichoderma* ejerce el control de fitopatógenos a través de los siguientes mecanismos: competición, liberación de antibióticos y micoparasitismo (Tronsmo y Hjeljord, 1998).

Se han desarrollado estrategias de control biológico de *F. graminearum* usando cepas del género *Trichoderma*, las cuales pueden afectar las estructuras de sobrevivencia del patógeno presente en los rastrojos. En este sentido Fernández (1992) encontró una reducción significativa en la formación de peritecios de *Gibberella zeae* (anam. *Fusarium graminearum*) y en la producción de ascosporas en aquellos tratamientos donde *T. harzianum* fue aplicado sobre rastrojo de trigo. Se mencionan como mecanismos de antagonismo la producción de enzimas capaces de degradar paredes fúngicas y la producción de sustancias antifúngicas (Mondino y Vero, 2006).

En Uruguay se inició una línea de trabajo que incluyó el aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de rastrojo de trigo, la identificación de todas las cepas obtenidas, y la caracterización de dichas cepas por su potencialidad como agente de biocontrol de *F. graminearum*. Para estimar la potencialidad como agente de biocontrol las cepas fueron caracterizadas por su capacidad de producir distintas enzimas y compuestos antifúngicos, y por su habilidad para inhibir el crecimiento del patógeno en condiciones *in vitro*. Con los resultados de esta caracterización se logró seleccionar cinco cepas de *Trichoderma* que fueron posteriormente evaluadas *in vitro* por su capacidad de inhibir la producción de peritecios de *G. zeae* (anamorfo *F. graminearum*) sobre rastrojo de trigo. Las cinco cepas evaluadas lograron disminuir significativamente la producción de peritecios sobre el rastrojo de trigo, incluso una de las cepas logró inhibir la formación de peritecios hasta un 85% respecto al testigo (Cabrera, 2009).

En la EEMAC - Facultad de Agronomía en el 2009 se inició una línea de trabajo que busca identificar el efecto de distintas medidas de manejo sobre las poblaciones nativas de *Trichoderma*. La información obtenida permitirá no sólo identificar factores que

favorecen altas poblaciones nativas ya presentes allí, sino además identificar ambientes que favorezcan el desarrollo de *Trichoderma* y de esta forma asegurar un mejor ambiente para realizar las inoculaciones de cepas eficientes para el biocontrol de los principales patógenos de cultivos extensivos (Pérez y Villar, 2011).

1.4.3.2. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Pseudomonas* fluorescentes

Los microorganismos benéficos son importantes ya que pueden tener gran incidencia en el desarrollo de las plantas y por consiguiente en el rendimiento de cultivos de interés agronómico. En su conjunto, los microorganismos rizosféricos que son capaces de estimular el crecimiento de las plantas o disminuir el daño provocado por patógenos fueron denominados por Kloepper y Schroth (1978) como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

A su vez, el efecto promotor ejercido por estos microorganismos puede clasificarse en directo o indirecto (Bashan y Holguin, 1997). Los mecanismos directos de promoción vegetal involucran la producción de fitohormonas y la solubilización de fosfato mineral y otros nutrientes facilitando su adquisición por las raíces (microorganismos fitoestimulantes y biofertilizantes). Los mecanismos indirectos hacen referencia al control biológico de patógenos que afectan el desarrollo de la planta huésped (biopesticidas).

A nivel mundial se ha generado un gran interés por el estudio de rizobacterias, siendo las *Pseudomonas* fluorescentes las más estudiadas en la actualidad (Höfte y Altier, 2010). Este grupo se destaca por su abundancia en la rizósfera, su versatilidad catabólica, su habilidad para colonizar raíces y su capacidad para producir compuestos tóxicos para una amplia gama de bacterias y hongos fitopatógenos (Walsh *et al.*, 2001).

En Uruguay, desde 1995, se ha investigado en el control biológico de enfermedades de implantación causadas por *Pythium*, mediante el uso de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de suelo rizosférico (Bagnasco *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000; De La Fuente *et al.*, 2002; De La Fuente *et al.*, 2004; Bajsa *et al.*, 2005; Yanes *et al.*, 2004; Quagliotto *et al.*, 2009; Höfte y Altier, 2010). Existe vasta información que reporta el manejo de estos patógenos a través del uso de bacterias rizosféricas productoras de antibióticos y otros compuestos bioactivos (Höfte y Altier 2010).

La cepa *Pseudomonas fluorescens* UP61 fue aislada de la rizósfera de plantas sanas de *Lotus corniculatus* (Colonia, Uruguay). De la Fuente *et al.* (2004) estudiaron los mecanismos implicados en el control biológico ejercido por dicha cepa, capaz de controlar especies patógenas pertenecientes a los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, a través de la producción de tres antibióticos: 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina.

Otros mecanismos de acción de las *Pseudomonas* fluorescentes sobre patógenos de suelo incluyen la producción de ácido cianhídrico (HCN) y sideróforos fluorescentes (Bagnasco *et al.*, 1998, De la Fuente *et al.*, 2004). *Pseudomonas fluorescens* se caracteriza por producir un pigmento amarillo-verdoso que corresponde a los sideróforos de tipo pioverdina, los cuales fluorescen cuando son observados bajo luz ultravioleta (Meyer y Abdallah, 1978). Los sideróforos son moléculas orgánicas

producidas por muchos microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro, que quelatan el ion férrico con alta especificidad (Neilands, 1981).

1.4.4. Factores determinantes del desarrollo de la enfermedad

La ocurrencia de cambios en las prácticas agrícolas -secuencia de cultivos, tipo de laboreo y aplicación de agroquímicos- que afectan la microflora del suelo y la disponibilidad de nutrientes, generalmente resulta en cambios en la expresión de enfermedades (Huber y Graham, 1999; van Elsas *et al.*, 2002; Garbeva *et al.*, 2004). Meriles *et al.* (2006) señalan que el uso de herbicidas y el manejo del rastrojo pueden alterar el ecosistema del suelo, mediante efectos directos en los diversos componentes de la microflora edáfica, por ejemplo sobre los patógenos, antagonistas y micorrizas. Estos efectos pueden resultar en un incremento o disminución de las enfermedades de las plantas, a través de la supresión o promoción de las actividades de los microorganismos benéficos presentes en la rizósfera (Altman y Rovira, 1989; Lévesque y Rahe, 1992).

La rizósfera es la estrecha zona del suelo que rodea las raíces y es afectada por las mismas. En ella existe una gran abundancia de nutrientes que son liberados por la planta en forma de exudados, lisados y mucílagos, que favorecen el establecimiento y desarrollo de una amplia diversidad de microorganismos que pueden ser perjudiciales, neutros o beneficiosos para los vegetales (Schroth y Hancock, 1982). Esta zona se caracteriza por sus rápidos cambios y una intensa actividad microbiana que puede ser entre 10 y 1000 veces superior que en las zonas libres de plantas (Haas y Défago, 2005). Las plantas depositan más del 40% de sus fotosintatos en la rizósfera a través de las raíces, lo cual sugiere un relacionamiento muy evolucionado entre la planta y los microorganismos rizosféricos. Estos a su vez se benefician de los nutrientes secretados por las raíces (Handelsmann y Stabb, 1996; Bloemberg y Lugtenberg, 2001).

Johal y Huber (2009) argumentan sobre el efecto directo del glifosato sobre las comunidades de microorganismos benéficos y patógenos, así como sobre las interacciones microbianas. Sus estudios demostraron un efecto negativo sobre los microorganismos benéficos y una estimulación del desarrollo de patógenos. Asimismo, indicaron que el glifosato modifica la disponibilidad de nutrientes y altera la virulencia de los patógenos hacia las plantas.

Lévesque *et al.* (1987) observaron infecciones severas en raíces de plantas tratadas con glifosato, debido a la inhibición de la síntesis de fitoalexinas, compuestos resultantes del metabolismo secundario a través de la vía del ácido shikimico. La inhibición de este mecanismo de defensa de las plantas resultó en una mayor predisposición al ataque de hongos patógenos de suelo (*Fusarium* spp.) y contribuyó a la eficacia del herbicida glifosato, siendo considerado un “segundo modo de acción”.

Existen muchos reportes acerca del aumento en la incidencia de enfermedades luego de aplicaciones de glifosato. Bolliger *et al.* (2006) encontraron que luego de algunos años de aplicaciones frecuentes de glifosato se incrementaba la ocurrencia de problemas tanto en la productividad como en el estado sanitario de las plantas. Johal y Rahe (1990) señalaron que el glifosato puede suprimir las defensas de las plantas y promover la susceptibilidad a enfermedades.

1.5. Efectos del glifosato sobre las comunidades microbianas edáficas

Diversos autores estudiaron el efecto *in vitro* del glifosato en el crecimiento radial de distintos hongos de suelo. Algunos evaluaron la molécula ácida aunque la mayoría investigaron el efecto de diversos formulados comerciales. Meriles *et al.* (2006) condujeron ensayos *in vitro* y encontraron un efecto inhibitorio del glifosato (Glifosato Roundup® Ultra) en el crecimiento radial de la mayoría de los hongos de suelo estudiados. Sanogo *et al.* (2000) señalaron que la germinación de esporas y crecimiento micelial de *F. solani* se redujo con aplicaciones de glifosato. Asimismo Wardle y Parkinson (1990c) encontraron que el glifosato reduce el crecimiento radial de *F. oxysporum*. Kawate *et al.* (1992) estudiaron el efecto de la sal de isopropilamina de glifosato en el crecimiento micelial de *F. solani* f. sp. *psi* y *P. ultimum*. Dada la disminución de pH que ocurre cuando se agrega glifosato al medio de cultivo, estos autores discriminaron los efectos causados por la molécula y aquellos debidos al cambio de pH. Sus resultados mostraron que el glifosato afectó a *Fusarium* independientemente del pH, mientras que para *Pythium* la respuesta fue parcialmente dependiente de los cambios de pH.

Haney *et al.* (2000) y Busse *et al.* (2001) concluyeron que la actividad microbiana se vio estimulada en presencia del herbicida glifosato. Wardle y Parkinson (1990a,b) observaron que la presencia de glifosato en suelo estaba relacionada con un aumento temporal del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias y la actividad microbiana del suelo, pero no encontraron mayor efecto sobre el número de UFC de hongos. La actividad microbiana puede aumentar en la rizósfera de plantas tratadas con glifosato (Mijangos *et al.*, 2009). Por el contrario, de acuerdo a Schulz *et al.* (1985), las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes fueron mayores en la rizósfera de soja no resistente a glifosato, mientras que en la soja resistente las poblaciones se vieron reducidas. Esto se explica por la susceptibilidad de las bacterias al glifosato que es exudado en la rizósfera (Wardle y Parkinson, 1992).

Diversos autores mencionan el aumento de *Fusarium* spp. en la rizósfera y en el suelo en respuesta al agregado de glifosato (Lévesque *et al.*, 1987; Powell y Swanton, 2008). Varias enfermedades causadas por *Fusarium* spp. se ven incrementadas por el glifosato (Sanogo *et al.*, 2000; Sanogo *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2005). Cuando la exudación radicular es excesiva, como en los cultivos de soja transgénicos tratados con glifosato, las infecciones radiculares causadas por los patógenos del suelo aumentan (Nelson, 1990). Asimismo, aumentos en la susceptibilidad al síndrome de muerte súbita en soja causado por *F. solani sensu lato*, fueron reportados en cultivos de soja transgénicos tratados con glifosato en Estados Unidos (Sanogo *et al.*, 2000).

A su vez se observó mayor colonización de *Fusarium* spp. en las raíces de trigo y cebada asociadas a aplicaciones previas de glifosato (Fernández *et al.*, 2007). Se ha sugerido que el efecto del glifosato persiste en plantas en crecimiento por dos o más años luego de la aplicación. Fernández *et al.* (2009) señalaron que las aplicaciones de glifosato 18 a 36 meses previas a la siembra fueron un factor agronómico importante en el desarrollo de enfermedades, principalmente fusariosis de la espiga en cultivos de trigo y cebada.

La severidad de podredumbre radicular en remolacha azucarera (*Beta vulgaris* (*saccharifera*) L.) resistente a glifosato, causada por *F. oxysporum*, aumentó con

aplicaciones del herbicida, como consecuencia de una mayor susceptibilidad de los tejidos de la planta (Larson *et al.*, 2006). Por otro lado, aplicaciones de glifosato sobre plantas de porotos indujeron la colonización de raíces por *Pythium* spp., aumentando la población del suelo. Descalzo *et al.* (1998) argumentaron que la muerte de las raíces proveyó de sustrato aumentando los niveles de inóculo de los microorganismos fitopatógenos.

Levesque *et al.* (1987) encontraron que el número de UFC de *Fusarium* spp. aumentaba debido a las aplicaciones de glifosato. Asimismo, señalaron un incremento temporal de poblaciones de microorganismos, específicamente de *Pythium* y *Fusarium* al aumentar las concentraciones de glifosato. Sin embargo, no se observó una correlación significativa entre las concentraciones de glifosato y la población de *Trichoderma* spp. El efecto del glifosato sobre microorganismos benéficos ha sido menos estudiado. Se destaca el reporte de Kremer y Means (2009) quienes señalan que las *Pseudomonas* fluorescentes exhibieron la enzima 3-enolpiruvil-siquimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS) sensible a glifosato y fueron inhibidas por este principio activo.

Diversos autores han señalado que tratamientos repetidos de glifosato actúan seleccionando determinadas especies de hongos que tienen la capacidad de utilizar el herbicida como nutriente (Krzysko-Lupicka y Orlik, 1997). Específicamente Krzysko-Lupicka y Sudol (2008) encontraron que aplicaciones sucesivas de glifosato resultaron en una comunidad de hongos dominada por *Fusarium* spp.

Araújo *et al.* (2003), a través del estudio con glifosato estándar analítico, observaron una mayor cantidad de dióxido de carbono en presencia de glifosato, lo que sugiere que los microorganismos del suelo son capaces de utilizar el glifosato como fuente de carbono. A su vez, Wardle y Parkinson (1990a) sugieren que la producción de dióxido de carbono está relacionada con la descomposición de glifosato en el suelo. En concordancia con Heinonen-Tanski (1989), los suelos con mayor actividad microbiana favorecen la rápida degradación del glifosato.

Es probable que el glifosato estimule la proliferación de patógenos indirectamente porque las malezas que mueren a raíz de las aplicaciones pueden servir de fuente de energía para *Fusarium* y *Pythium*, potencialmente incrementando el inóculo de ambos patógenos (Kawate *et al.*, 1992). Powell y Swanton (2008) señalan que el glifosato y la soja resistente al glifosato pueden promover la colonización de hongos en las raíces y potenciar la enfermedad no sólo estimulando el desarrollo de hongos patógenos sino también suprimiendo las bacterias antagonistas.

1.6. Justificación del trabajo

Existe vasta información acerca de los efectos de los formulados de glifosato sobre los microorganismos del suelo, pero se desconoce cuál es realmente el compuesto que causa los mayores perjuicios en la biota. En el presente trabajo se pretende identificar si el efecto tóxico está dado por la molécula de glifosato *per se*. A su vez se quiere conocer cual es el grado de toxicidad, tanto de la molécula ácida como de dos de las sales (de potasio y de isopropilamina), sobre microorganismos patógenos y benéficos para las plantas, así como sobre la interacción entre ambos. Para ello se propuso trabajar con géneros de microorganismos fitopatógenos y benéficos predominantes en los sistemas de producción de interés para el Uruguay.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se plantea como hipótesis del trabajo que la aplicación de glifosato altera la composición de las comunidades microbianas del suelo, benéficas y patógenas. Específicamente se postula que la molécula de glifosato afecta el crecimiento de los microorganismos del suelo, la interacción entre benéficos y patógenos, y su densidad poblacional.

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento del efecto del uso de glifosato sobre los microorganismos del suelo en sistemas agrícolas del Uruguay.

2.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar *in vitro* el efecto de la molécula de glifosato sobre el crecimiento de microorganismos patógenos: *Fusarium* spp. y *Pythium* spp.
- Evaluar *in vitro* el efecto de la molécula de glifosato sobre el crecimiento de microorganismos benéficos: *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas fluorescens*.
- Evaluar *in vitro* el efecto de la molécula de glifosato sobre la interacción entre microorganismos patógenos y benéficos.
- Evaluar *in vitro* el efecto de la molécula de glifosato sobre la producción de peritecios de *Giberella zae* / *Fusarium graminearum* en rastrojo.
- Evaluar el efecto del uso de la molécula de glifosato sobre las poblaciones microbianas del suelo, en invernáculo.

2.2. Estrategia de trabajo

Para analizar el efecto del glifosato, se utilizó la molécula ácida inicial común a todos los formulados comerciales y dos de sus sales neutralizadas sal de potasio y sal de isopropilamina. Se seleccionaron aislados microbianos pertenecientes a especies patógenas y benéficas prevalentes en sistemas agrícolas / hortícolas del país. En una primera etapa se realizaron ensayos *in vitro* evaluando el efecto de dosis crecientes de las moléculas sobre el crecimiento radial de cultivos microbianos puros. Luego se hicieron experimentos con cultivos duales para evaluar su efecto de la molécula sobre la interacción entre microorganismos patógenos y benéficos. En una tercer etapa se estudió *in vitro* el efecto de la molécula ácida sobre la producción de peritecios (estructura de inóculo primario de la Fusariosis de la Espiga - FE-) de una cepa de *F. graminearum* patogénica en rastrojo de trigo. Finalmente, se instaló un ensayo macetero en invernáculo, con suelo extraído de parcelas con distinta intensidad de uso, secuencia de cultivos y frecuencia de aplicaciones de glifosato; se aplicaron dosis crecientes de glifosato ácido para evaluar la densidad poblacional de microorganismos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Moléculas de glifosato

Para realizar el presente estudio se seleccionó la molécula ácida de glifosato y dos de sus sales neutralizadas, las cuales fueron cedidas por la compañía Cibeles S.A. de Uruguay. En los distintos experimentos se utilizaron dosis crecientes de dichas moléculas, 0, 20, 60, 100 y 140 ppm de i.a.

Molécula ácida

Debido a que la solubilidad de la molécula ácida (glifosato ppa, 95% de pureza) es de 12000 ppm a 25 °C (EXTOXNET, 1996), la misma se diluyó a razón de 0.105 g en 10 mL de agua deionizada, para lograr una solución con concentración inicial de 10.5 g/L. Dada la fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, donde C_i (concentración inicial) = 10.5 g/L, V_f (Volumen final) = 0.1 L de medio de cultivo, se calculó la relación de C_f (Concentración final) y V_i (Volumen inicial), para obtener las dosis crecientes a evaluar (Cuadro 1).

Cuadro 1: Relación entre Volumen inicial y Concentración final deseada de las moléculas evaluadas.

Cf (ppm)	Vi (mL)
20	0.2
60	0.6
100	1.0
140	1.4

Sal de isopropilamina

La concentración de la sal de isopropilamina es de 480 g/L, lo que se corresponde con 360 g/L del equivalente ácido, resultando en una relación de 1.33. Por lo tanto, para obtener una solución con concentración inicial equivalente a 10.5 g/L de la molécula ácida, se diluyeron 0.3 mL de la solución de sal de isopropilamina en 9.7 mL de agua deionizada. El cálculo se presenta en el anexo 2a.

Sal de potasio

La concentración de la sal de potasio es de 602 g/L, lo que se corresponde con 500 g/L del equivalente ácido, resultando en una relación de 1.204. Por lo tanto, para obtener una solución con concentración inicial equivalente a 10.5 g/L de la molécula ácida, se diluyeron 0.21 mL de la solución de sal de potasio en 9.79 mL de agua deionizada. El cálculo se presenta en el anexo 2b.

Para llegar a las distintas concentraciones de interés se calculó la relación de C_f (Concentración final) y V_i (Volumen inicial) de la misma forma que para la molécula ácida (Cuadro 1).

3.2. Aislados microbianos

Las características de los aislados microbianos utilizados en los experimentos se detallan a continuación en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Características de los aislados evaluados.

Género	Especie	Código	Origen	Colección
<i>Fusarium</i>	<i>solani sensu lato</i>		Corona de soja	INIA La Estanzuela, Sección Protección Vegetal.
<i>Fusarium</i>	<i>graminearum</i>	224 a	Grano de trigo	INIA La Estanzuela, Sección Protección Vegetal.
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	17.8	Cebolla	INIA Las Brujas, Sección Protección Vegetal.
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i>	17.8B8	Cebolla	INIA Las Brujas, Sección Protección Vegetal.
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>		Frutilla	INIA Las Brujas, Sección Protección Vegetal.
<i>Pythium</i>	<i>debaryanum</i>		Alfalfa	IIBCE, Laboratorio de Ecología Microbiana.
<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>	TME	Rastrojo de trigo	Facultad de Química – UdelaR, Laboratorio de Microbiología.
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	T35	Rastrojo de trigo	Facultad de Química – UdelaR, Laboratorio de Microbiología.
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	UP 61.2	Lotus	IIBCE, Laboratorio de Ecología Microbiana.

3.3. Ensayos in vitro

Los ensayos *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Protección Vegetal de INIA Las Brujas, en el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE y en el Laboratorio de Fitopatología de INIA La Estanzuela.

3.3.1. Cultivos puros

3.3.1.1. Microorganismos patógenos

Se evaluó el crecimiento de *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *P. debaryanum* en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA Difco), conteniendo diferentes concentraciones de glifosato ácido, sal de potasio y sal de isopropilamina (0, 20, 60, 100, 140 ppm i.a.) según Meriles *et al.* (2006). Las tres soluciones de glifosato fueron esterilizadas con filtro desechable de 0,45 µm e incorporadas al medio PDA. Se determinó el pH de la solución de las diferentes concentraciones de las tres moléculas

de glifosato, en PDA a 50°C, y no se observó variación ante el agregado de las dosis utilizadas en este estudio (pH=5). A partir de cepas conservadas en tubos con silica gel, los aislados se sembraron en placas de Petri con PDA, se tomó con un anza un trozo de micelio y se sembró en placa de Petri con PDA. *Pythium debarianum*, conservado a 4°C en tubo eppendorf con agua destilada estéril, se sembró en medio de cultivo corn meal agar (CMA Oxoid). De cada cepa se cortaron discos de micelio en activo crecimiento de 5 mm de diámetro y se colocó un disco en el centro de cada placa conteniendo PDA conteniendo las diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato.

El diseño experimental fue de parcelas completas al azar con arreglo factorial de los tratamientos (tres moléculas x cinco dosis), con tres repeticiones simultaneas. Las placas se incubaron a 25 °C con fotoperíodo de 12 horas y se midió el crecimiento radial diario hasta un máximo de 8,5 cm de diámetro, considerado el máximo desarrollo en la placa de Petri (Meriles *et al.*, 2006). Cada ensayo fue repetido al menos dos veces.

Para estimar el efecto de las distintas dosis y moléculas de glifosato sobre el crecimiento microbiano se calculó la variable área debajo de la curva (ADC), adaptación del método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990). Dicha variable integra cada uno de los momentos, desde el día de instalación del ensayo hasta que la colonia del microorganismo alcanza el máximo desarrollo en la placa de Petri. El valor absoluto de la sumatoria del ADC se considera el mejor estimador de la velocidad de crecimiento del microorganismo.

3.3.1.2. Microorganismos benéficos

El crecimiento de *Trichoderma atroviride* y *T. harzianum* se evaluó siguiendo el mismo procedimiento detallado para los microorganismos patógenos.

La sensibilidad de *Pseudomonas fluorescens* se evaluó en medio de cultivo King B (King *et al.*, 1954), conteniendo dosis crecientes de cada una de las moléculas de glifosato estéril (0, 20, 60, 100, 140 ppm i.a.). La cepa de *Ps. fluorescens* conservada en tubo eppendorf con glicerol al 25% a -20 °C se repicó en placas con medio King B. Se suspendió una ansada de cultivo de *Ps. fluorescens* en tubos conteniendo 5 mL de King B Broth. Los tubos se colocaron en agitador rotatorio a 150 rpm y 30 °C durante 24 horas. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro Shimadzu UV-1603, utilizando una longitud de onda de 620 nm y se obtuvo una concentración de $1 \cdot 10^9$ UFC/mL. Se colocó un mL de la suspensión en 10 mL de agua deionizada estéril y se realizaron diluciones seriadas las cuales se sembraron en placas de KB conteniendo las diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato. El diseño experimental fue de parcelas completas al azar, con tres repeticiones. Las placas se incubaron a 30°C y 48 horas después de la siembra se hizo el recuento de colonias en placa, bajo luz UV. Se calculó la variable unidades formadoras de colonias (UFC) (Quezado – Duval *et al.*, 2003). El ensayo fue repetido dos veces.

3.3.1.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* fueron analizados por ANOVA, utilizando el programa PROC GLM de SAS System versión 9.2. Para los aislados *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *Py. debaryanum*, *T. atroviride* y *T. harzianum*, la variable analizada fue ADC. Para la cepa de *Ps. fluorescens* la variable analizada fue

UFC/mL. Las medias de los tratamientos fueron separadas por mínima diferencia significativa (MDS), mediante el test de Fisher protegido con $p= 0.05$.

3.3.2. Cultivos duales

3.3.2.1. Cultivo dual *Fusarium* spp. – *Trichoderma* spp.

Se realizaron cultivos duales de diferentes cepas de *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* y *F. solani* con dos cepas de *Trichoderma*: *T. harzianum* y *T. atroviride* en placas con medio PDA enmendadas con dosis crecientes de cada una de las moléculas de glifosato (0, 20, 60, 100 y 140 ppm i.a.).

A partir de cepas conservadas en tubos con silica gel, se sembraron placas de PDA, se tomó con un anza un trozo de micelio y se sembró en placa de Petri con PDA. Se cortaron discos de micelio en activo crecimiento de 5 mm de diámetro. En cada placa de PDA conteniendo las diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato se colocó en el centro un disco de *Fusarium* spp. y en un extremo un disco del hongo antagonista *T. harzianum* o *T. atroviride* de acuerdo a la metodología descrita por Cabrera (2006). El diseño experimental fue de parcelas completas al azar con arreglo factorial de los tratamientos (tres moléculas x cinco dosis). Se realizaron tres repeticiones de cada combinación de cepas de *Fusarium* y *Trichoderma*. Se incluyeron los testigos de crecimiento de la cepa patógena en ausencia del antagonista. Las placas se incubaron a 25°C con fotoperíodo 12 horas. Cada ensayo fue repetido al menos dos veces.

Para estimar el efecto de dosis crecientes de cada molécula de glifosato sobre la interacción de patógeno y antagonista se evaluó el área de crecimiento de cada microorganismo, a través del Programa MAP Maker (<http://www.mapmaker.com/download.asp>). Asimismo, se calculó la variable relación área del antagonista / área del patógeno.

3.3.2.2. Cultivo dual *Pythium debaryanum* - *Pseudomonas fluorescens*

La actividad antagónica de *Ps. fluorescens* contra *Py. debaryanum* fue evaluada en un ensayo de inhibición *in vitro* mediante el método de cultivo dual en placa descrito por Geels y Schippers (1983).

A partir de discos de micelio en activo crecimiento de 5 mm de diámetro, conservados en tubo eppendorf con agua destilada a 4°C, el aislado de *Py. debaryanum* se repicó a placas con medio CMA, a partir de la cual se cortaron discos de 5 mm de diámetro. La cepa de *Ps. fluorescens* conservada en tubo eppendorf con glicerol al 25% a –20 °C se repicó en placas con medio King B. En placas con medio King B/2 (apto para el crecimiento tanto de *Py. debaryanum* como de *Ps. fluorescens* enmendado con dosis crecientes de cada una de las moléculas de glifosato, (0, 20, 60, 100 y 140 ppm i.a.), se cultivaron en el centro de cada placa un disco de *Py. debaryanum* y en un extremo una estría de *Ps. fluorescens*.

El diseño experimental fue de parcelas completas al azar con arreglo factorial de los tratamientos (tres moléculas x cinco dosis), con tres repeticiones. Las placas se incubaron a 25°C por cuatro días. Se incluyeron los testigos de crecimiento de la cepa

patógena en ausencia del antagonista. El ensayo fue repetido dos veces. La variable analizada fue zona de inhibición entre el antagonista y el patógeno, medida en cm, tomando la menor distancia entre ambos.

3.3.2.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* de cultivos duales fueron analizados por ANOVA, utilizando el programa PROC GLM de SAS System versión 9.2. Para los cultivos duales *Fusarium* spp. - *Trichoderma* spp., la variable analizada, dado que el patógeno no se vio mayormente afectado durante la evaluación, fue el área de crecimiento del antagonista y la relación área antagonista sobre área patógeno. Para los cultivos duales de *P. fluorescens* – *P. debaryanum* la variable analizada fue cm de inhibición entre ambos. Las medias de los tratamientos fueron separadas por mínima diferencia significativa (MDS), mediante el test de Fisher protegido con $p=0.05$

3.4. Ensayo de *Fusarium graminearum* en rastrojo de trigo

En el Laboratorio de Fitopatología de La Estanzuela, se instaló el ensayo de evaluación de dosis crecientes de glifosato ácido sobre la producción de peritecios de *Giberella zeae*/ *F. graminearum* en rastrojo de trigo.

El rastrojo de trigo se cortó en trozos de tres cm de largo conteniendo un nudo en el centro. Se cortaron 600 trozos de rastrojo y se autoclavaron. A su vez se autoclavó arena que sirvió de soporte para los trozos de rastrojo.

Para la preparación del inóculo se sembró *F. graminearum* en placas con medio de cultivo de grano de soja (Anexo 3), se incubó a 25°C durante siete días. Para colectar el patógeno se mojó el micelio con agua destilada, se raspó con una espátula y se filtró con una gasa. Se homogeneizó y se contabilizó el número de conidias en la cámara de Neubauer, hasta alcanzar una concentración de 2×10^5 conidios/mL. El rastrojo de trigo, luego de ser esterilizado se inoculó por inmersión durante un minuto en dicha suspensión y se secó en papel de filtro. Se colocaron 100 gr de arena estéril en placas de 15 cm de diámetro. Sobre la arena se colocaron 15 trozos de rastrojo previamente inoculados y se distribuyeron en forma homogénea. El rastrojo se incubó a 20 - 22°C con ciclos de luz blanca fría (F40/CW Worklite 25; Phillips, Sommerset, NJ) y luz negra fluorescente (F40T12/BLB TL40W/08; Phillips, Sommerset, NJ) durante 21 días.

Las placas se mantuvieron tapadas los dos primeros días luego de la inoculación para facilitar la colonización del rastrojo por *F. graminearum*, y luego destapadas hasta el fin del experimento. Cada cuatro o cinco días se regaron las placas con agua estéril para generar ciclos de mojado y secado del rastrojo que promovieran la formación de peritecios. El diseño experimental consistió en parcelas completas al azar con seis repeticiones. Se prepararon 30 unidades experimentales.

Al cabo de 21 días se comenzó a observar la aparición de peritecios de *G. zeae*/*F. graminearum* en el rastrojo. Se realizó la primera evaluación del número de peritecios por rastrojo y la evaluación de su estado de madurez según la escala de Paulitz (Bujold *et al.*, 2001). De cada placa se seleccionaron 10 trozos de rastrojo y se contó bajo lupa con un aumento de 30X el número de peritecios por rastrojo. Se extrajeron al azar dos

peritecios de cada uno de los 10 rastros. Estos se observaron bajo lupa para determinar el estado de madurez.

Los tratamientos fueron aplicados luego de observar la aparición de peritecios para generar una situación similar a lo que ocurre en el campo. Para ello se preparó una suspensión de glifosato, molécula ácida, al 0,2 % en agua destilada, se homogeneizó y se aplicó por aspersión hasta mojar los trozos de rastrojo. Los tratamientos fueron:

T0	0	Testigo sin aplicación de glifosato (solo agua destilada)
T1	0,5X	Subdosis comercial de glifosato
T2	X	Dosis comercial (3L/ha: guía sata: http://laguiasata.com/joomla/)
T3	X+X	Dosis comercial en dos momentos consecutivos (espaciados 30 días)
T4	2X	Doble dosis comercial

Se realizaron evaluaciones mensuales del número y estado madurez de los peritecios 30, 60 y 90 luego de aplicados los tratamientos.

3.4.1. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del experimento de *Fusarium graminearum* en rastrojo de trigo fueron analizados por ANOVA, utilizando el programa PROC GLM de SAS System versión 9.2. Las medias de los tratamientos fueron separadas por mínima diferencia significativa (MDS), mediante el test de Fisher protegido con P= 0.05.

3.5. Ensayos en invernáculo

3.5.1. Muestreo y análisis de suelo

El muestreo de suelo se realizó en un experimento de rotaciones bajo siembra directa en INIA La Estanzuela (Departamento de Colonia) en otoño de 2009. Se muestrearon dos parcelas de tratamientos contrastantes en cuanto a sistema de cultivo y frecuencia en uso de glifosato. El tratamiento “Cultivo continuo (CC)” fue tomado de la parcela de agricultura continua con tres aplicaciones de glifosato por año (soja – cebada y girasol – trigo) y el tratamiento “Rotaciones con pradera (ROT)” de la parcela de rotación cultivo con pradera (sorgo grano húmedo – raigras, moha y durante cuatro años festuca, lotus y trébol blanco) y sin aplicaciones de glifosato desde dos años atrás. El muestreo de suelo se realizó con calador a 10 cm de profundidad, extrayéndose 30 tomas al azar, posteriormente homogeneizadas.

Cada tratamiento (CC y ROT) se dejó secar a temperatura ambiente y se desagregó para su posterior manipulación. Luego se mezcló el suelo con arena estéril (2:1 respectivamente), para disminuir la compactación del suelo al ser colocado en macetas. Las propiedades fisicoquímicas de cada tratamiento se determinaron en el Laboratorio de Suelos de INIA La Estanzuela. El nivel de residuos de glifosato y su metabolito (AMPA) se analizó en el Laboratorio de Residuos de Plaguicidas, de la Dirección General de Servicios Agrícolas. La determinación de la población de microorganismos de interés se realizó en el Laboratorio de Protección Vegetal de INIA Las Brujas, de acuerdo a lo descrito en el ítem 3.5.2.4.

3.5.2. Ensayo macetero

3.5.2.1. Preparación de macetas

Cada uno de los tratamientos (CC y ROT), previamente mezclados con arena estéril, se colocaron en macetas de 1000 mL de capacidad y se llevaron al invernáculo, preparándose 25 macetas de cada suelo.

3.5.2.2. Siembra e incorporación de avena

Cada maceta conformó una unidad experimental. Se sembraron 15 semillas de avena en cada una de las macetas para incluir el componente vegetal en el sustrato. Se regaron hasta que el agua drenara por debajo y a los dos días se registró el peso de cada maceta. De esta forma se sistematizó el riego semanalmente, manteniendo cada maceta a su capacidad de campo. Las macetas fueron regadas semanalmente hasta que las plantas de avena alcanzaron aproximadamente 20 cm de altura. Posteriormente se incorporó la avena al suelo, se cortó con tijera en trozos de dos cm y se mezcló con el suelo. Se separó una muestra inicial de cada maceta, la cual se conservó a 4°C. El resto del suelo se reincorporó a cada maceta, se regó hasta drenar por debajo y se registró el peso a los dos días de regado.

3.5.2.3. Aplicación de tratamientos

Para realizar la aplicación de los tratamientos, de dosis crecientes de glifosato ácido, se preparó una suspensión de glifosato al 0,2 % en agua deionizada, se homogeneizó y se regó uniformemente a razón de 100 mL por maceta. Los tratamientos aplicados fueron:

T0	0	Testigo sin aplicación de glifosato (solo agua destilada)
T1	0,5X	Subdosis comercial de glifosato
T2	X	Dosis comercial (3L/ha: guía sata: http://laguiasata.com/joomla/)
T3	X+X	Dosis comercial en dos momentos consecutivos (espaciados 14 días)
T4	2X	Doble dosis comercial

Luego de aplicados los tratamientos, se realizaron muestreos de suelo mensuales, utilizando un calador de 10 mm, tomando cuatro sub muestras por maceta, conformando una muestra de aproximadamente 100 g por maceta, la cual se conservó a 4°C. Se registró la temperatura y humedad relativa del invernáculo durante todo el ensayo con un datalogger. El diseño estadístico consistió en un arreglo factorial de dos suelos x cinco tratamientos, con diseño experimental en bloques completos al azar con cinco repeticiones.

En cada aplicación del herbicida glifosato, considerándose una dosis comercial de 3 L/ha (48% de i.a.), un volumen de agua de 100 L/ha, se aplicarían en la superficie del suelo aproximadamente 15 ppm de i.a. Considerando una situación extrema de aplicación de 6 L/ha y con un volumen de agua de 60 L/ha, se aplicarían aproximadamente 50 ppm de i.a.

3.5.2.4. Determinación de poblaciones microbianas

Se determinó la población microbiana de patógenos y antagonistas presentes en el suelo para cada sitio muestreado (CC y ROT) y en el momento inmediato previo a imponer los tratamientos (valor inicial), a un mes (valor medio) y a dos meses (valor final). Se determinó peso seco de suelo en estufa a 105°C durante 48 horas.

Evaluación de *Pythium* spp.

Se preparó medio CMA específico para *Pythium* spp. (Anexo 3). Se pesó un gramo de suelo fresco y se colocó en un Erlenmeyer conteniendo agar agua al 0.4 %, en agitación para su homogenización. Se sembraron tres mL en cada placa de Petri, con tres repeticiones. Se dejaron en cámara de crecimiento durante tres días a 25°C. Se hizo el recuento de colonias por placa, contabilizando las colonias típicas de *Pythium* spp. y se calculó la variable UFC/g suelo seco. Esta determinación sólo se obtuvo para CC y ROT en el momento de la toma de la muestra.

Evaluación de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium* spp.

Se preparó medio peptona pentacloronitrobenzoceno agar (PCNB) (Anexo 3) específico para *Fusarium* spp. (Nelson, 1983), y medio Komada específico para *Fusarium oxysporum* (Anexo 3) (Komada, 1975) y se dispensó en placas de Petri. Cada muestra de suelo se secó a temperatura ambiente durante cuatro días. Con un mortero se molió el suelo y se tamizó en malla de 0,5 mm. Se pesó un gramo de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas en agar agua al 0,1 %. Un mililitro de cada dilución (-2, -3, -4, -5, -6 y -7) se plaqueó utilizando una espátula de Drigalski; cada dilución tuvo tres repeticiones. Se incubaron durante siete a nueve días a 25°C. La densidad poblacional se evaluó según número más probable (NMP) (<http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>), tomando como positivas las placas que presentaban al menos una colonia típica del aislado evaluado; y se calculó la variable UFC/g suelo seco.

Evaluación de *Trichoderma* spp.

Se preparó medio THSM específico para *Trichoderma* spp. (Anexo 3) (Williams *et al.*, 2003) y se dispensó en placas de Petri. Se pesó un gramo de suelo fresco de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas en agar agua al 0,1 %. Cien microlitros de cada dilución (-1, -2 y -3) se plaqueó utilizando una espátula de Drigalski; cada dilución tuvo tres repeticiones. Se incubaron durante cinco a siete días a 25°C. La densidad poblacional se evaluó según NMP, tomando como positivas las placas que presentaban al menos una colonia típica de *Trichoderma* spp.; y se calculó la variable UFC/g suelo seco.

Evaluación de *Pseudomonas* fluorescentes

Se preparó medio King B específico para *Pseudomonas* fluorescentes (Anexo 3) (King *et al.*, 1954) y se dispensó en placas de Petri. Se pesó un gramo de suelo fresco de cada muestra y se realizaron diluciones seriadas en agar agua al 0,1 %. Cien microlitros de cada dilución (-1, -2 y -3) se plaqueó utilizando una espátula de Drigalski; cada dilución tuvo tres repeticiones. Se incubaron durante 2 días a 28°C. Se hizo el recuento de colonias en placa, contabilizando las colonias fluorescentes bajo luz UV; y se calculó la variable UFC/g suelo seco.

3.5.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos maceteros fueron analizados por ANOVA, utilizando el programa PROC GLM de SAS System versión 9.2. Para analizar la densidad poblacional de *Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp. y de *Pseudomonas* fluorescentes se calculó la variable área debajo de la curva (ADC). Las medias de los tratamientos fueron separadas por mínima diferencia significativa (MDS), mediante el test de Fisher protegido con $P= 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Ensayo *in vitro* de cultivos puros

4.1.1. Microorganismos patógenos

El ADC resultó un buen indicador del crecimiento microbiano, permitiendo discriminar el efecto de dosis crecientes de cada una de las moléculas. El crecimiento de los aislados estudiados varió significativamente con el agregado de dosis crecientes de glifosato en sus tres fórmulas. En ningún caso la presencia de glifosato en el medio de cultivo estimuló el crecimiento. La magnitud de la reducción observada en el crecimiento fue diferente según la molécula utilizada y las dosis probadas (Cuadro 3).

Cuadro 3: Significancia del efecto de la molécula y la dosis en el crecimiento de microorganismos patógenos analizado como ADC, según ANOVA.

	Molécula	Dosis	Molécula x Dosis
<i>Fusarium solani</i>	**	NS	NS
<i>F. graminearum</i>	**	**	**
<i>F. oxy. f.sp. cepae</i>	**	**	*
<i>F. oxy. f.sp. cepae</i> Resistente	**	**	**
<i>F. oxy. f.sp. fragariae</i>	**	**	**
<i>Pythium debaryanum</i>	**	**	**

(** p< 0.01)

(* p< 0.05)

NS Diferencia no significativa

La molécula ácida demostró ser la que menos afectó el crecimiento de los aislados, en tanto la molécula sal de isopropilamina fue la que más lo afectó. En general la concentración mínima de glifosato que generó diferencias significativas en el crecimiento fue 100 ppm de i.a. en algunos casos y siempre 140 ppm de i.a.

Los microorganismos estudiados vieron afectado su crecimiento en forma diferencial. Dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato evaluadas no afectaron significativamente el crecimiento de *Fusarium solani* (Figura 5). Por el contrario, resultaron en una reducción significativa del crecimiento de *F. graminearum* (Figura 6), de los tres aislados de *F. oxysporum* (Figura 7, 8 y 9).

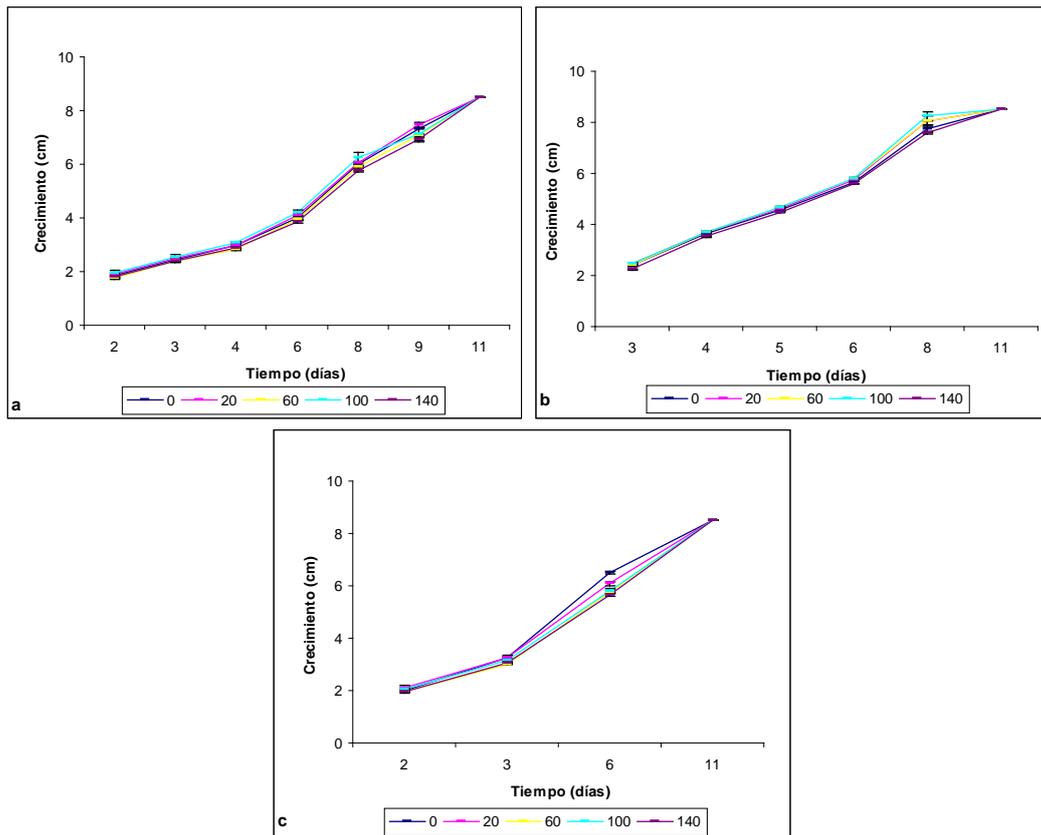


Figura 5: Crecimiento *in vitro* del aislado de *Fusarium solani* según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Las barras representan el error estándar de las medias.

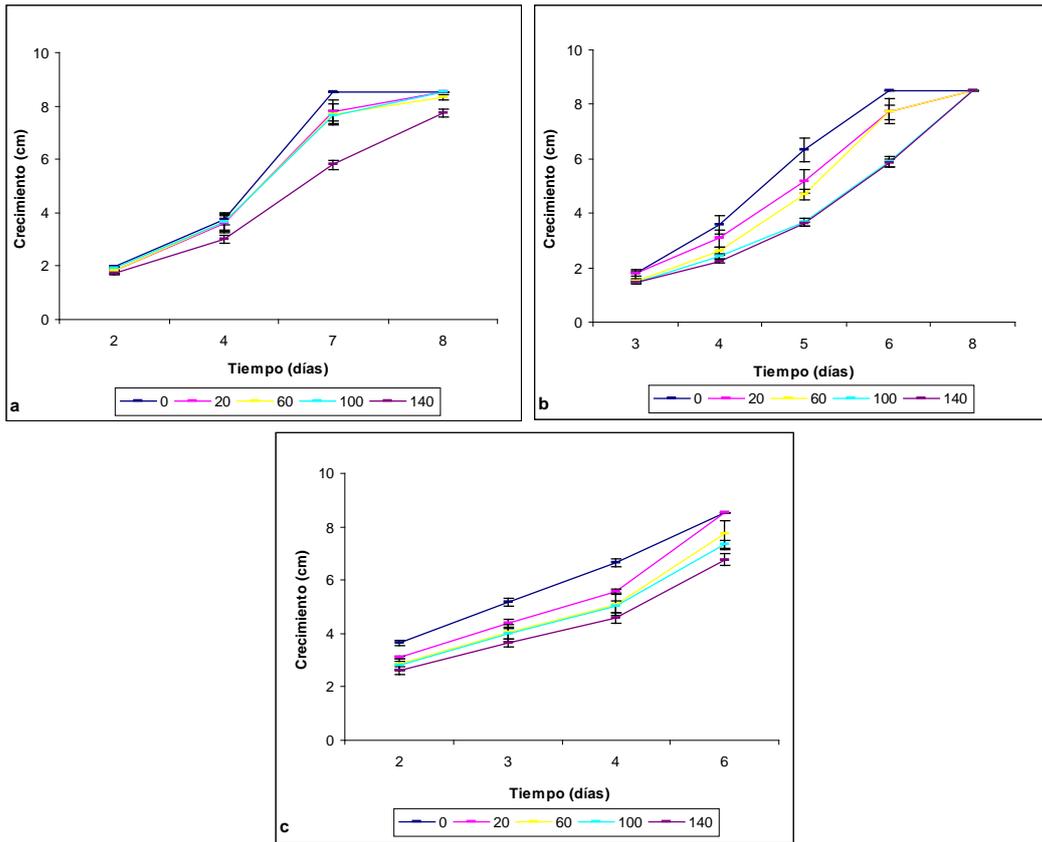


Figura 6: Crecimiento *in vitro* del aislado de *Fusarium graminearum* según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Las barras representan el error estándar de las medias.

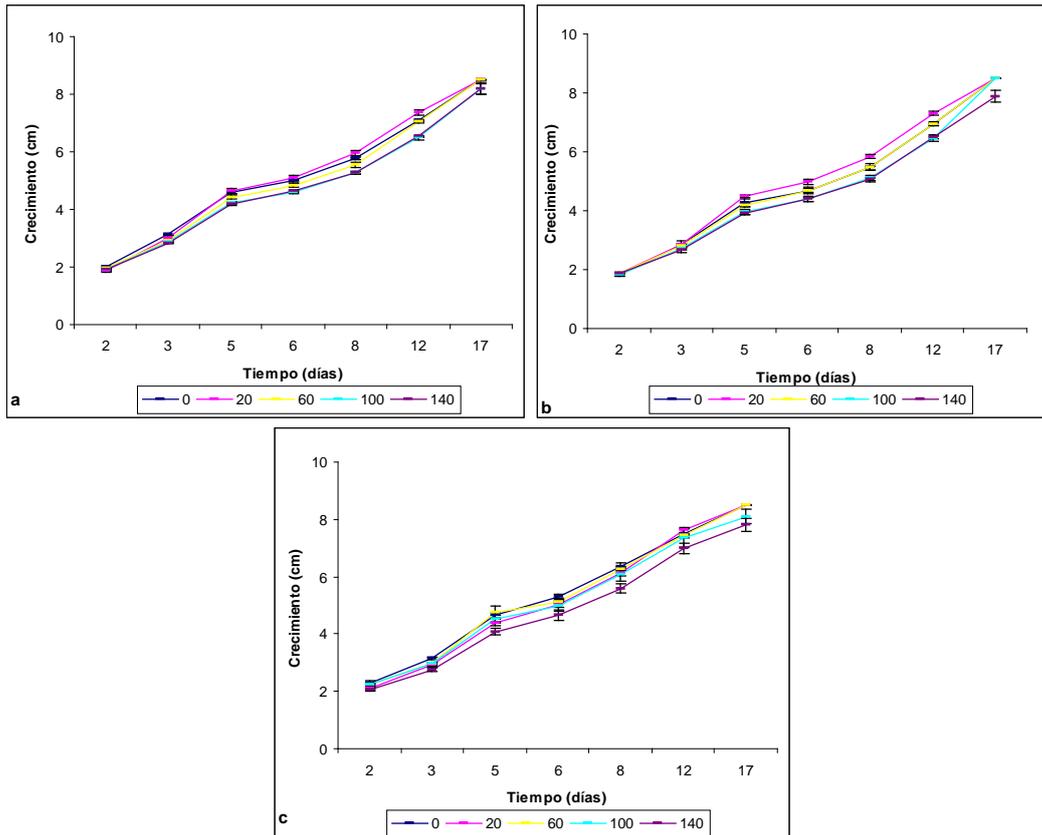


Figura 7: Efecto del agregado de dosis crecientes de glifosato ácido sobre el crecimiento *in vitro* de a) *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, b) *F. oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a Benomyl y c) *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*. Las barras representan el error estándar de las medias.

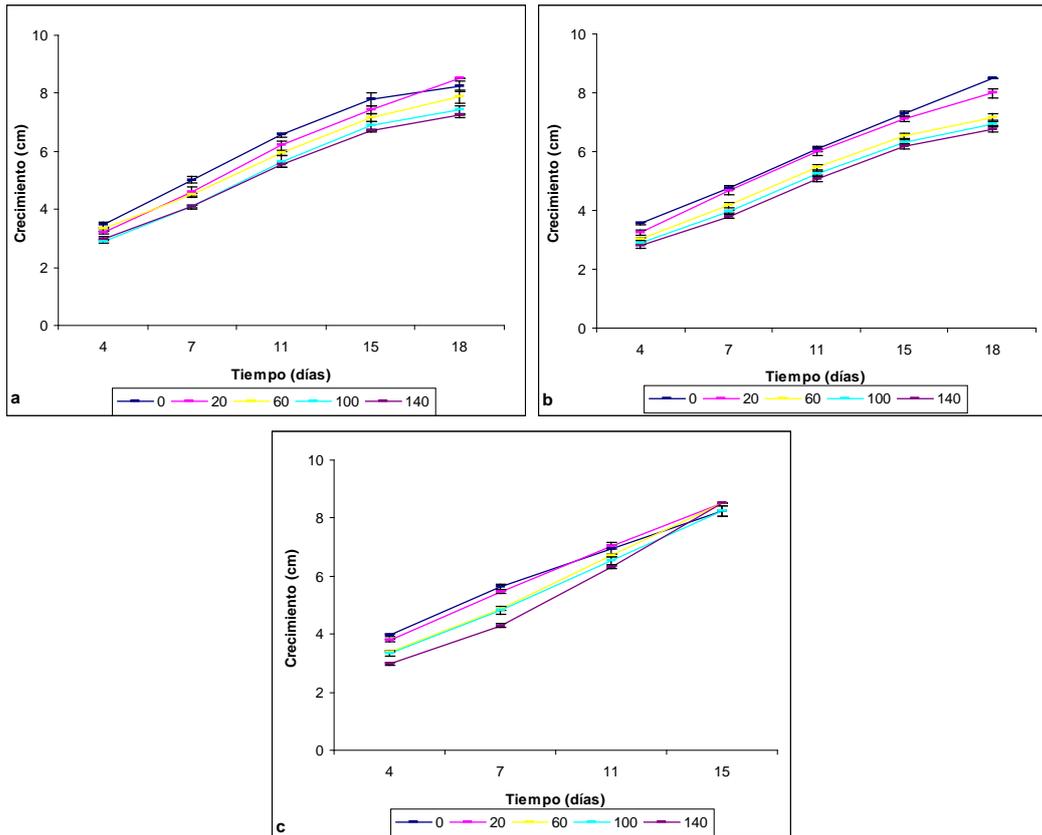


Figura 8: Efecto del agregado de dosis crecientes de glifosato como sal de potasio sobre el crecimiento *in vitro* de a) *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepa*e, b) *F. oxysporum* f.sp. *cepa*e resistente a Benomyl y c) *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*. Las barras representan el error estándar de las medias.

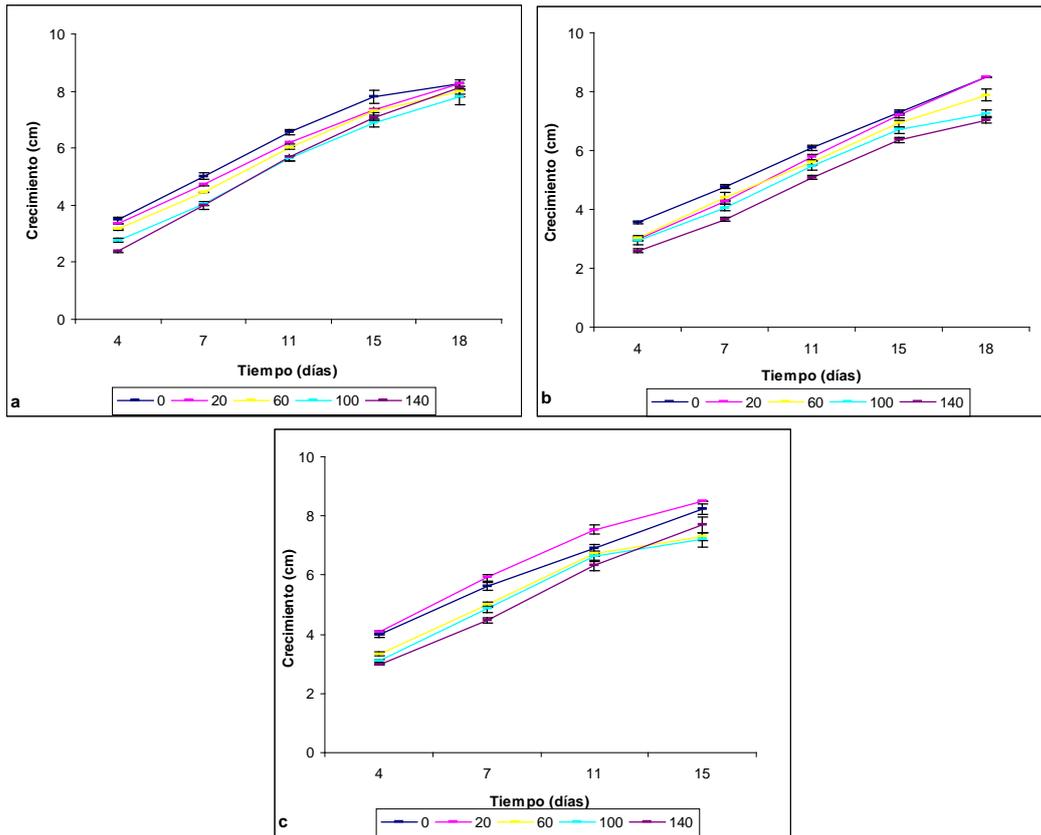


Figura 9: Efecto del agregado de dosis crecientes de glifosato como sal de isopropilamina sobre el crecimiento *in vitro* de a) *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, b) *F. oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a Benomyl y c) *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*. Las barras representan el error estándar de las medias.

Dosis crecientes de glifosato ácido y de sal de potasio resultaron en un enlentecimiento significativo del crecimiento del aislado de *Pythium debaryanum* en el primer día evaluado pero se igualaron los tratamientos al segundo día. En tanto dosis crecientes de sal de isopropilamina resultaron en una reducción significativa del crecimiento de *Py. debaryanum*, determinando un atraso en el número de días necesarios para completar la placa (Figura 10 y 11).

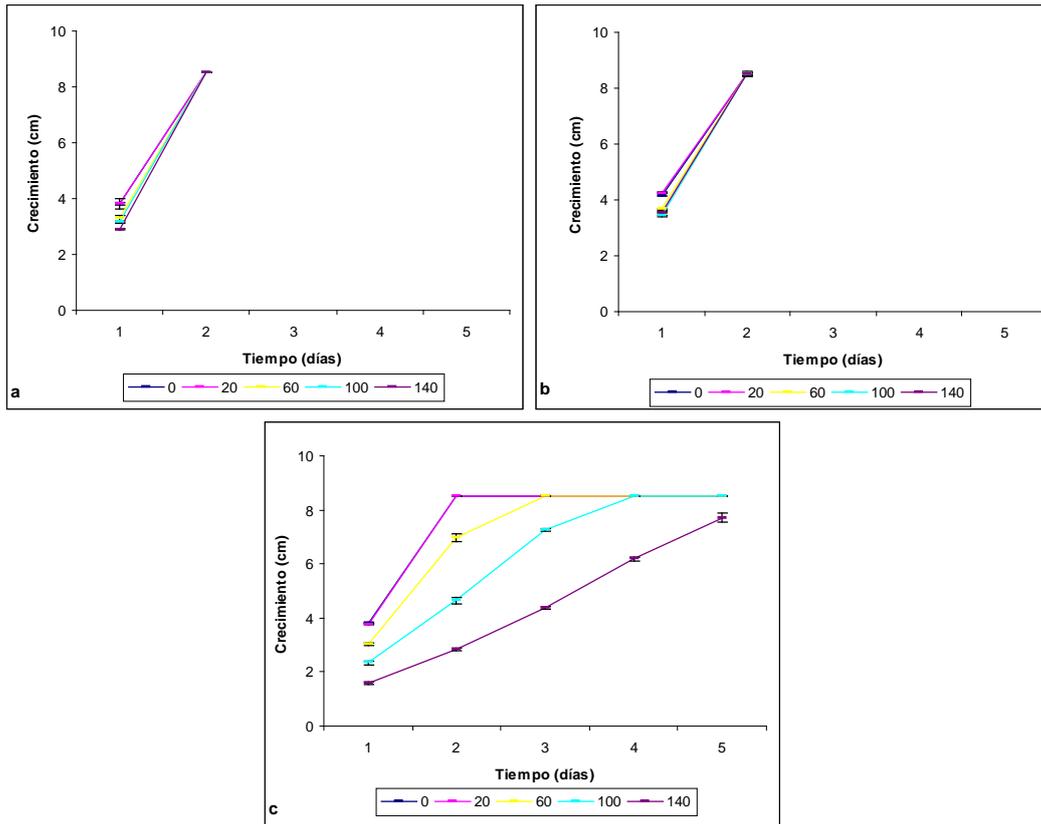


Figura 10: Crecimiento *in vitro* del aislado de *Pythium debaryanum* según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Las barras representan el error estándar de las medias.

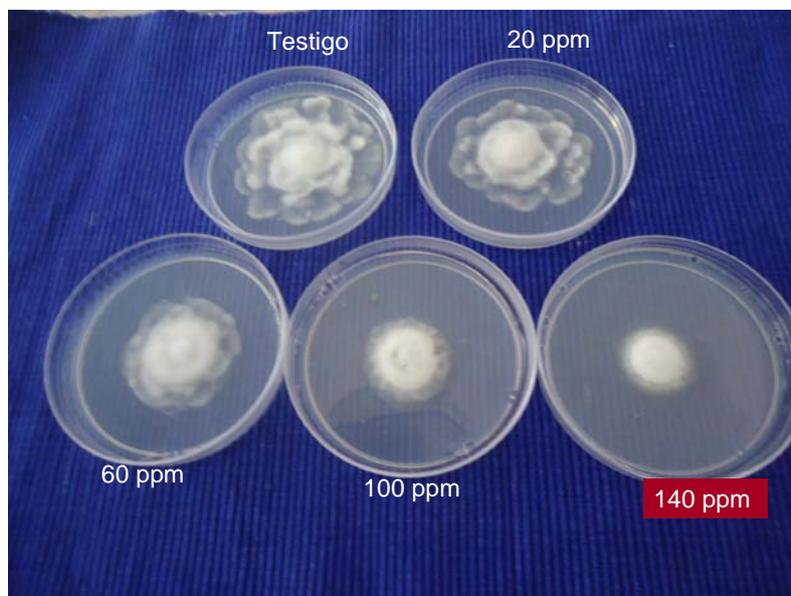


Figura 11: Crecimiento de *Pythium debaryanum* según diferentes dosis de sal de isopropilamina.

El ADC de los aislados estudiados varió significativamente con el agregado de dosis crecientes de glifosato en sus tres fórmulas, con excepción de *Fusarium solani*. La magnitud de la reducción observada en el crecimiento fue diferente según la molécula utilizada (Cuadro 4).

Cuadro 4: Significancia del efecto de la dosis de cada molécula de glifosato en el crecimiento de microorganismos patógenos analizado como ADC, según ANOVA.

	ÁCIDO	SAL DE POTASIO	SAL DE ISOPROPILAMINA
<i>Fusarium solani</i>	NS	NS	NS
<i>F. graminearum</i>	**	**	**
<i>F. oxy. f.sp. cepae</i>	**	**	**
<i>F. oxy. f.sp. cepae</i> Resistente	**	**	**
<i>F. oxy. f.sp. fragariae</i>	**	**	**
<i>Pythium debaryanum</i>	**	**	**

(** p< 0.01)

NS Diferencia no significativa

El crecimiento de *F. graminearum* fue similar al usar la molécula ácida y la sal de potasio. Sin embargo, el agregado de la sal de isopropilamina redujo significativamente el crecimiento, observándose valores de ADC = 26.2. Las dosis de 100 y 140 ppm afectaron por igual y se diferenciaron del resto (Figura 12).

El valor de ADC de *F. oxysporum* f.sp. *cepae* y de *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* fue igual en las dos sales analizadas y difirieron con la molécula ácida la cual resultó en un valor de ADC mayor. Dosis crecientes de glifosato no afectaron el crecimiento de forma diferencial (Figura 13 y 14).

El crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a benomyl fue diferente ante el agregado de las tres moléculas evaluadas, siendo la molécula ácida la que más afectó y la sal de potasio la que menos afectó el crecimiento. Dosis crecientes de glifosato no afectaron el crecimiento de forma diferencial (Figura 15).

El crecimiento de *Py. debaryanum* fue diferente en las tres moléculas evaluadas, siendo la sal de isopropilamina la que más afectó el crecimiento y la molécula ácida la que menos lo afectó. El efecto inhibitorio de la sal de isopropilamina causó un atraso en el número de días necesarios para completar la placa, lo que determinó valores de ADC mayores comparados con los obtenidos con el ácido y la sal de potasio (Figura 16). El tratamiento testigo y la dosis de 20 ppm de glifosato no afectaron el crecimiento y se diferenciaron de las dosis más altas, las cuales sí resultaron en una reducción significativa.

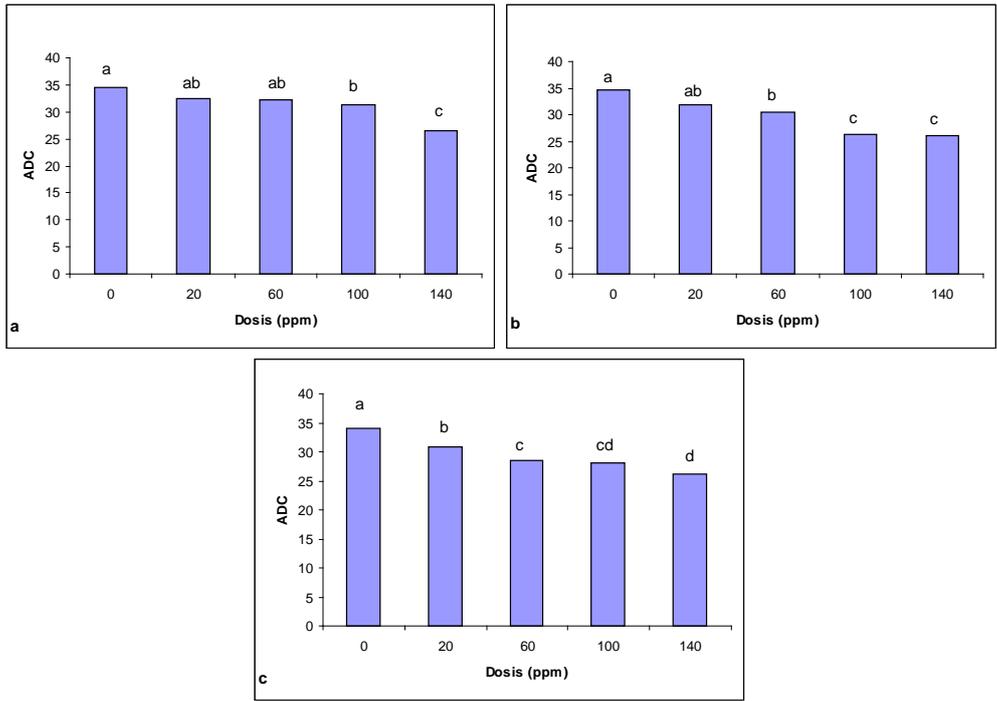


Figura 12: Área debajo de la curva (ADC) del aislado *Fusarium graminearum* en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato: a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p = 0,05$).

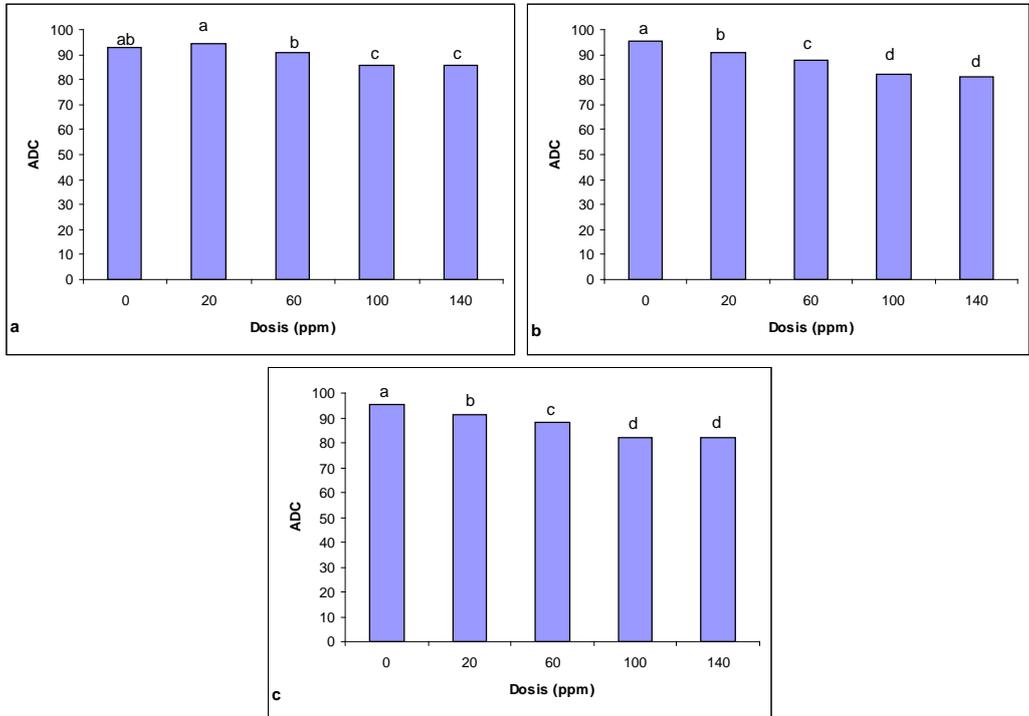


Figura 13: Área debajo de la curva (ADC) del aislado *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato: a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p = 0,05$).

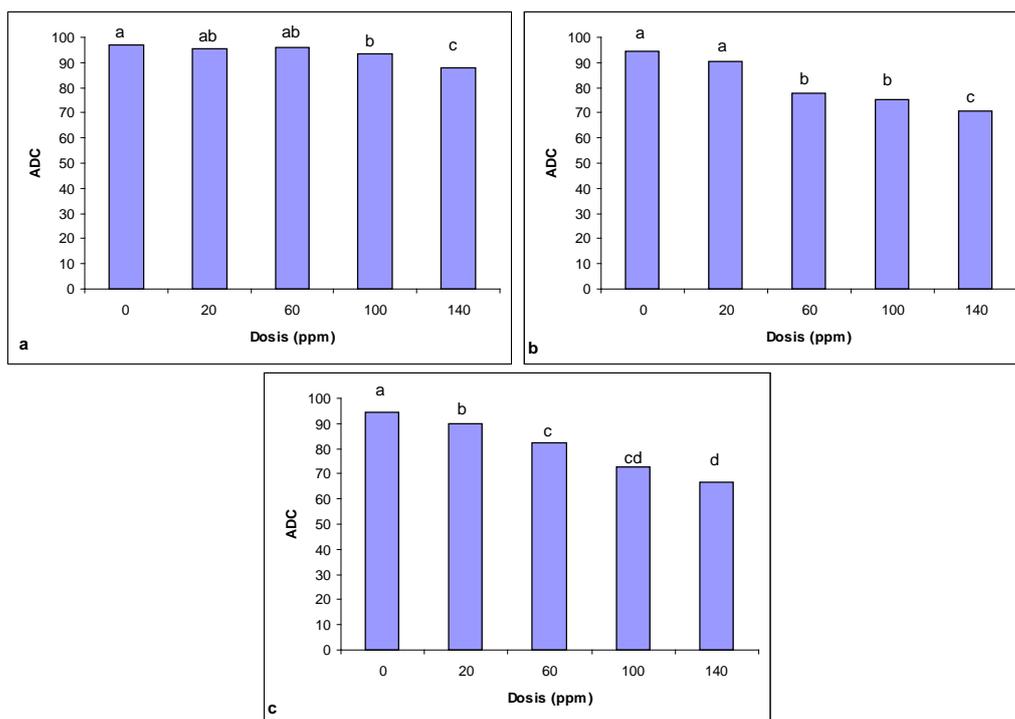


Figura 14: Área debajo de la curva (ADC) del aislado *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato: a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p=0,05$).

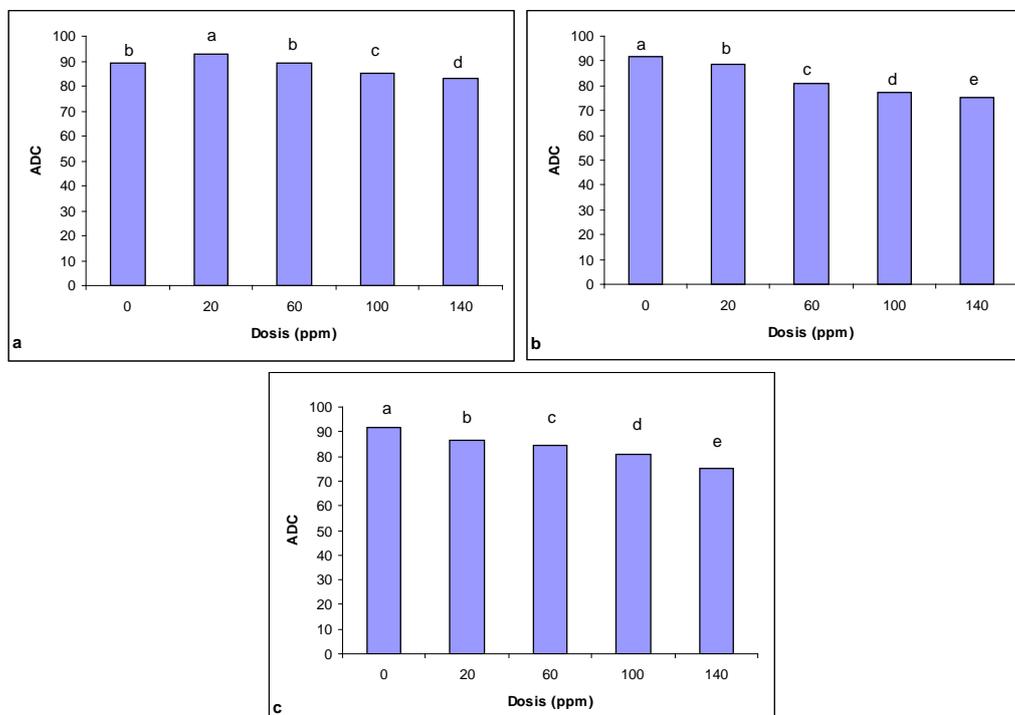


Figura 15: Área debajo de la curva (ADC) del aislado *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a Benomyl en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato: a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p=0,05$).

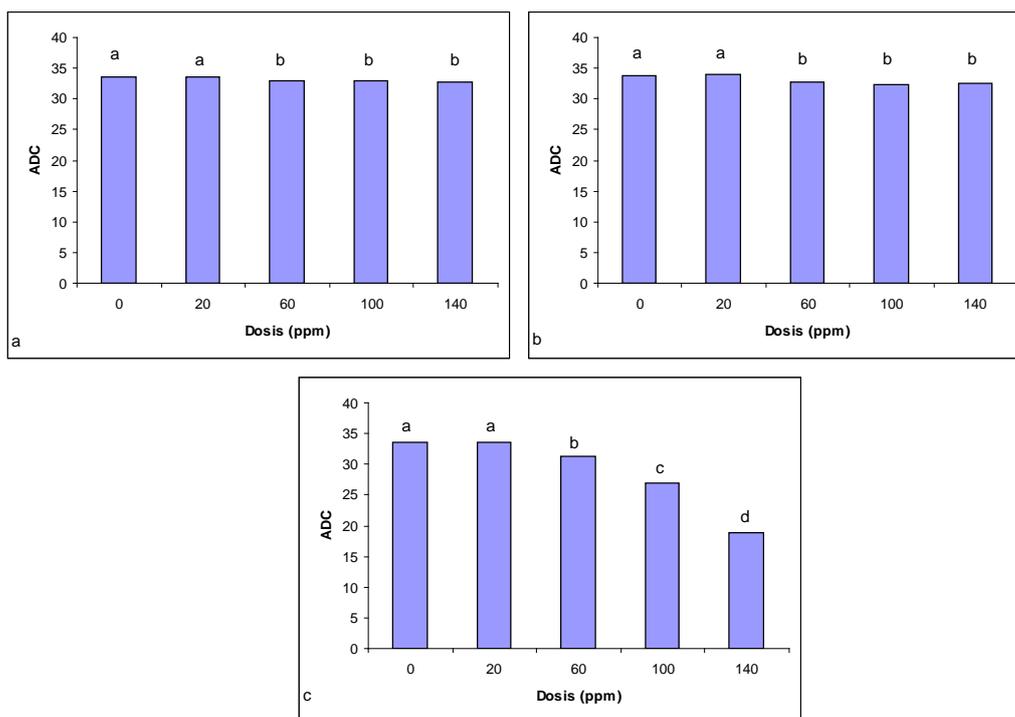


Figura 16: Área debajo de la curva (ADC) del aislado *Pythium debaryanum* en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato: a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p=0,05$).

4.1.2. Ensayo *in vitro* de cultivos puros benéficos

4.1.2.1. *Trichoderma* spp.

Al igual que los resultados obtenidos para los aislados patógenos, la respuesta en el crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp. evaluados frente al agregado de dosis crecientes de glifosato varió significativamente. Los resultados de los ANOVA indican que hubo efecto diferencial de las moléculas de glifosato, las dosis y su interacción en el valor de ADC de dos aislados de *Trichoderma* spp. (Cuadro 5)

Cuadro 5: Significancia del efecto de la molécula y la dosis en el crecimiento de *Trichoderma atroviride* (TME) y *T. harzianum* (T35) analizado como ADC, según ANOVA.

	Molécula	Dosis	Molécula x Dosis
<i>Trichoderma atroviride</i> TME	**	**	**
<i>Trichoderma harzianum</i> T35	**	**	**

(** $p < 0.01$)

El crecimiento de los aislados de *T. atroviride* y *T. harzianum* no se vio afectado por el agregado del ácido ni de la sal de potasio, pero sí ante el agregado de la sal de isopropilamina. Con las dosis más altas de la sal de isopropilamina, se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento, logrando completar la placa en un tiempo

mayor. A su vez, cuando se usó esta sal, la reducción del crecimiento fue más marcada para el aislado de *T. harzianum* respecto al aislado de *T. atroviride* (Figura 17 y 18). Cuando se usó la sal de potasio, sólo se redujo significativamente el crecimiento del aislado *T. atroviride* a la dosis de 140 ppm. (Cuadro 6).

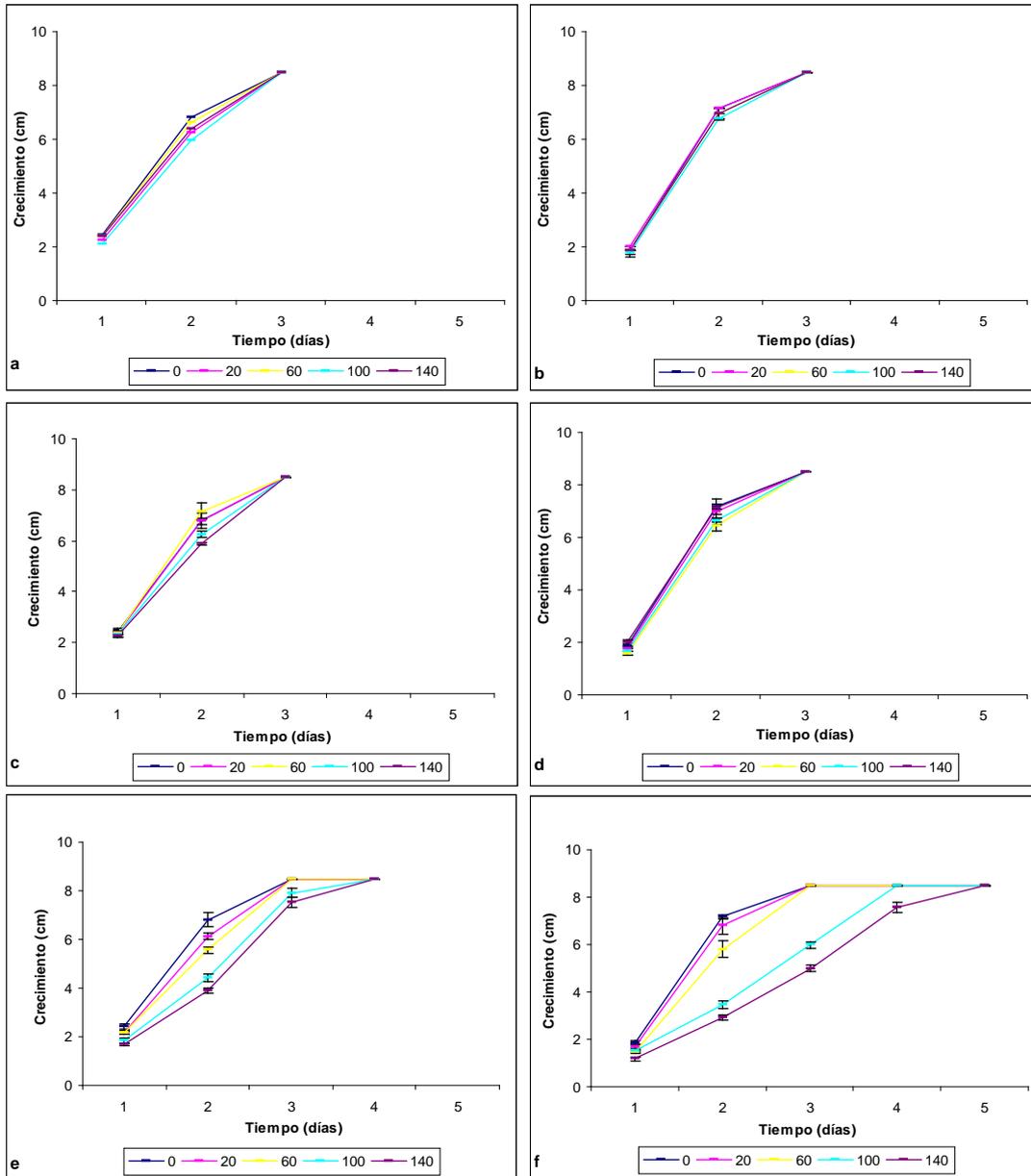


Figura 17: Crecimiento *in vitro* de aislados de *Trichoderma harzianum* (T35) y *T. atroviride* (TME) según diferentes concentraciones de las tres moléculas de glifosato. a) ácido TME, b) ácido T35, c) sal de potasio TME, d) sal de potasio T35, e) sal de isopropilamina TME, f) sal de isopropilamina T35. Las barras representan el error estándar de las medias.

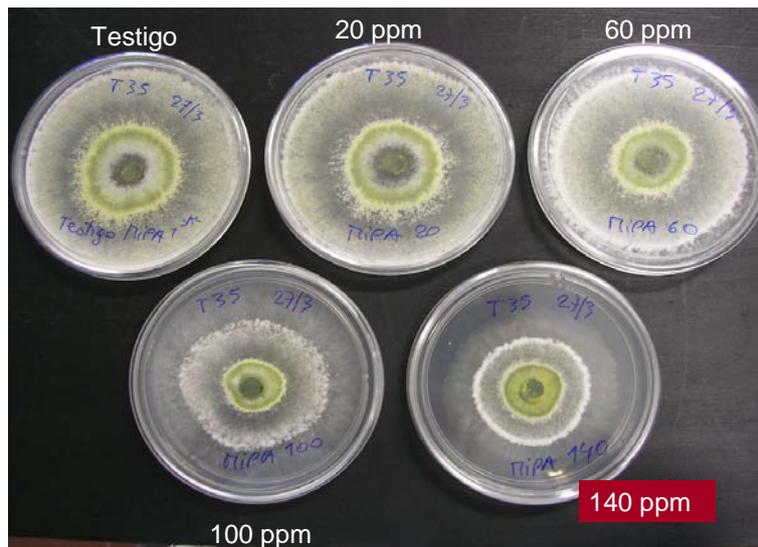


Figura 18: Crecimiento de *Trichoderma harzianum* según diferentes concentraciones de sal de isopropilamina.

El área debajo de la curva de los aislados de *Trichoderma* spp. estudiados varió significativamente con el agregado de dosis crecientes de glifosato como sal de isopropilamina; sin embargo, no mostró diferencias frente al agregado de la molécula ácida. La sal de potasio tuvo efecto sobre el ADC de TME, pero no sobre el ADC de T35 (Cuadro 6).

Cuadro 6: Significancia del efecto de la dosis de cada molécula de glifosato en el crecimiento de *Trichoderma atroviride* y *T. harzianum* analizado como ADC, según ANOVA.

	ÁCIDO	SAL DE POTASIO	SAL DE ISOPROPILAMINA
<i>Trichoderma atroviride</i> - TME	NS	**	**
<i>Trichoderma harzianum</i> - T35	NS	NS	**

(** p<0.01)

NS Diferencia no significativa

Los valores de ADC de ambos aislados calculados para la dosis de 140 ppm., demostraron la mayor sensibilidad de *T. harzianum* (T35) con respecto a *T. atroviride* (TME), siendo 12.9 y 17.3, respectivamente (Figura 19). Los diferentes aislados muestran diferentes velocidades de crecimiento. El ADC de *Trichoderma* spp. presentó valores de 20, mientras que el de *F. oxysporum* presentó valores de ADC de 90. Esto indica que *Trichoderma* spp. crece más rápidamente que *Fusarium* spp. logrando completar el crecimiento en la placa de Petri en un menor número de días.

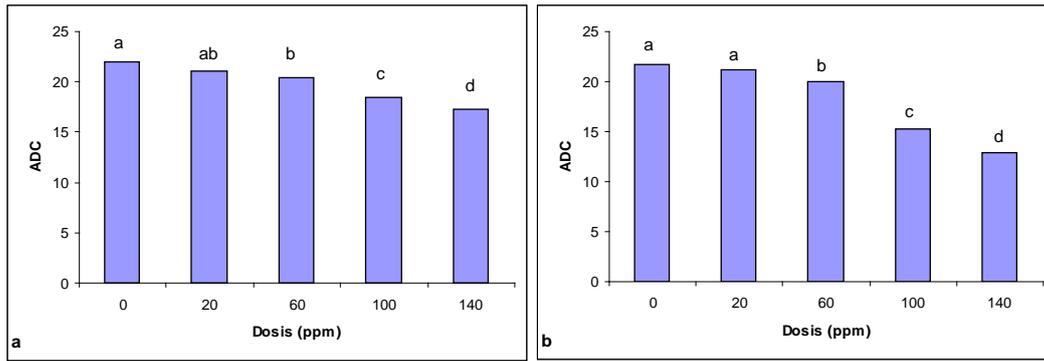


Figura 19: Área debajo de la curva (ADC) de *Trichoderma* spp. en función de dosis crecientes de la sal de isopropilamina a) TME; b) T35. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p=0,05$).

4.1.2.2. *Pseudomonas fluorescens*

Se observó que las dosis crecientes de glifosato como ácido no afectaron significativamente el número de UFC de *Pseudomonas fluorescens* ($p=0,476$). En cambio dosis crecientes de glifosato como sales resultaron en una reducción significativa del número de UFC de *Pseudomonas fluorescens*, siendo mayor en el caso de la sal de isopropilamina respecto a la sal de potasio ($p=0,07$) (Figura 20).

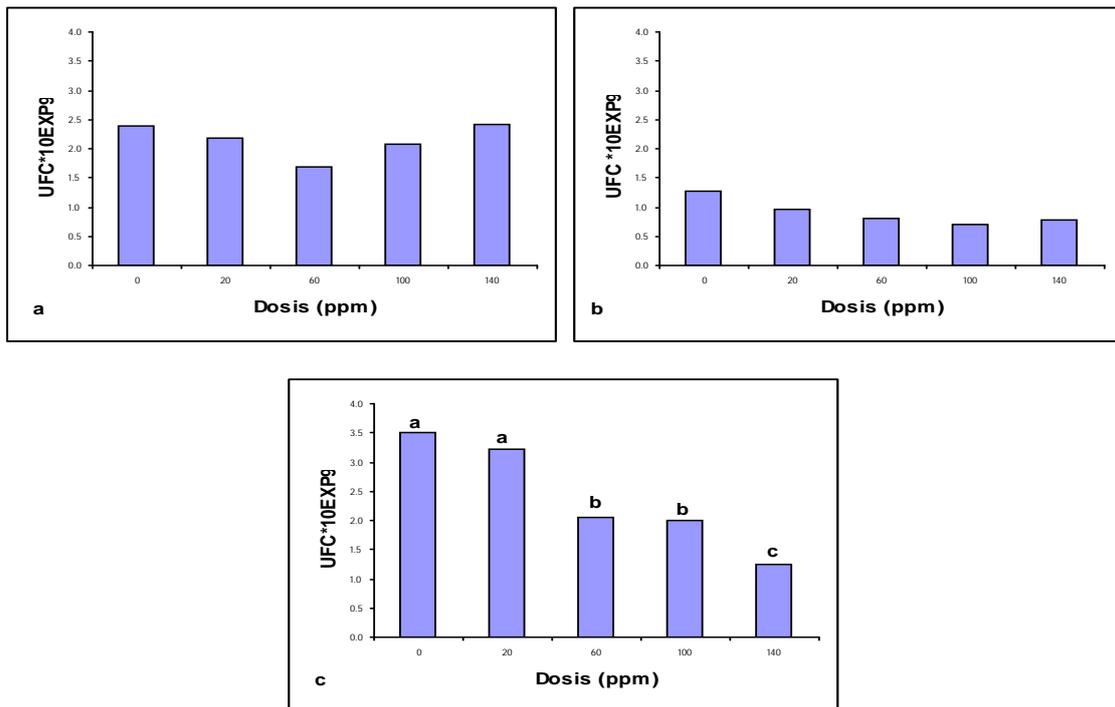


Figura 20: Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Pseudomonas fluorescens* en función de dosis crecientes de las tres moléculas de glifosato: a) ácido, b) sal de potasio, c) sal de isopropilamina. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p=0,05$).

4.2. Ensayo *in vitro* de cultivos duales

4.2.1. *Fusarium* spp. – *Trichoderma* spp.

El crecimiento de los antagonistas *T. atroviride* (TME) y *T. harzianum* (T35) se vio afectado significativamente en función del agregado de diferentes moléculas de glifosato al enfrentarse con diferentes aislados de *Fusarium* spp.

La sal de isopropilamina fue la que más afectó la interacción entre los aislados (Cuadro 7). Dosis crecientes de esta sal resultaron en reducciones significativas de las dos variables analizadas (crecimiento del antagonista y relación antagonista / patógeno). En contraste, la molécula ácida no afectó significativamente la interacción entre los aislados de *Trichoderma* spp con *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* ni con *F. solani*. El aislado T35 resultó más sensible que el TME a la aplicación de dosis crecientes de glifosato. Las dosis de 100 y 140 ppm de i.a. fueron las que más redujeron las variables analizadas.

Cuadro 7: Efecto de las dosis de cada molécula sobre el crecimiento de dos aislados de *Trichoderma* spp. en cultivos duales con tres aislados de *Fusarium* spp.

Aislado	Molécula	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i>
<i>F. oxy</i> f.sp. <i>cepae</i> Resist.	Ácido	NS	**
<i>F. oxy</i> f.sp. <i>cepae</i> Resist.	Sal de potasio	NS	**
<i>F. oxy</i> f.sp. <i>cepae</i> Resist.	Sal de isopropilamina	**	**
<i>F. oxy</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Ácido	NS	NS
<i>F. oxy</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Sal de potasio	NS	**
<i>F. oxy</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Sal de isopropilamina	**	**
<i>F. solani</i>	Ácido	NS	NS
<i>F. solani</i>	Sal de potasio	**	NS
<i>F. solani</i>	Sal de isopropilamina	**	**

(** p< 0.01)

NS Diferencia no significativa

Dosis crecientes de glifosato ácido y de la sal de potasio no afectaron significativamente el crecimiento del antagonista *T. atroviride* (TME) al enfrentarlo con *F. oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a benomyl. En tanto sí resultaron en una reducción significativa del crecimiento del antagonista *T. harzianum* (T35) a la dosis de 140 ppm. Dosis crecientes de la sal de isopropilamina resultaron en una reducción significativa del crecimiento de los antagonistas *T. atroviride* (TME) y *T. harzianum* (T35) al enfrentarlos con el *F. oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a benomyl (Figura 21).

Cuando los aislados de *Trichoderma* spp. fueron enfrentados con el *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*, dosis crecientes de glifosato ácido no afectaron el crecimiento del antagonista. En contraste, dosis crecientes de sal de isopropilamina resultaron en una reducción significativa del crecimiento de los dos aislados de *Trichoderma* spp. Dosis crecientes de sal de potasio no afectaron significativamente el crecimiento del antagonista *T. atroviride* (TME) al enfrentarlo con *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*. Aunque resultaron en una disminución significativa del crecimiento del antagonista *T. harzianum* (T35) (Figura 22).

Cuando los aislados de *Trichoderma* spp. fueron enfrentados con el aislado de *F. solani*, dosis crecientes de glifosato ácido no afectaron el crecimiento del antagonista. En contraste, dosis crecientes de sal de isopropilamina resultaron en una reducción significativa del crecimiento de *Trichoderma* spp. Las dosis crecientes de sal de potasio resultaron en una disminución significativa del crecimiento del antagonista *T. atroviride* (TME) al enfrentarlo con *F. solani*. Sin embargo, no afectaron significativamente el crecimiento del antagonista *T. harzianum* (T35) (Figura 23 y 24).

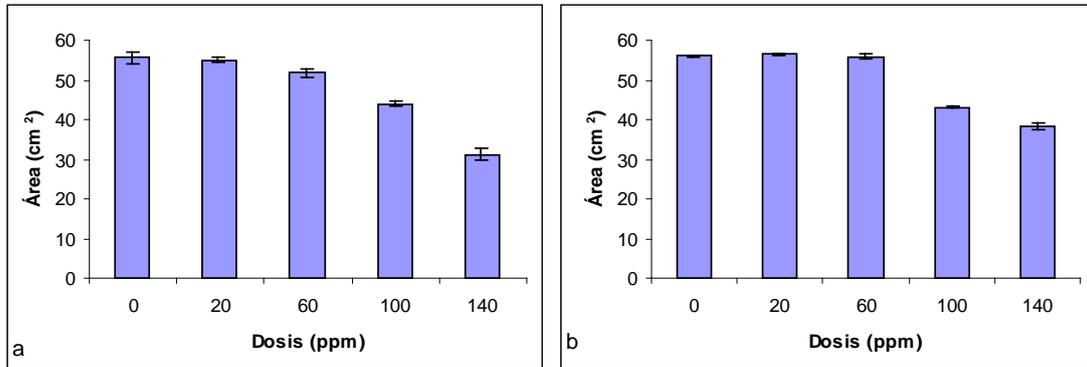


Figura 21: Área de crecimiento de los antagonistas *Trichoderma atroviride* (TME) (a) y *T. harzianum* (T35) (b) testados en cultivos duales con *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* resistente a benomyl, en función de dosis crecientes de sal de isopropilamina. Las barras representan el error estándar de las medias.

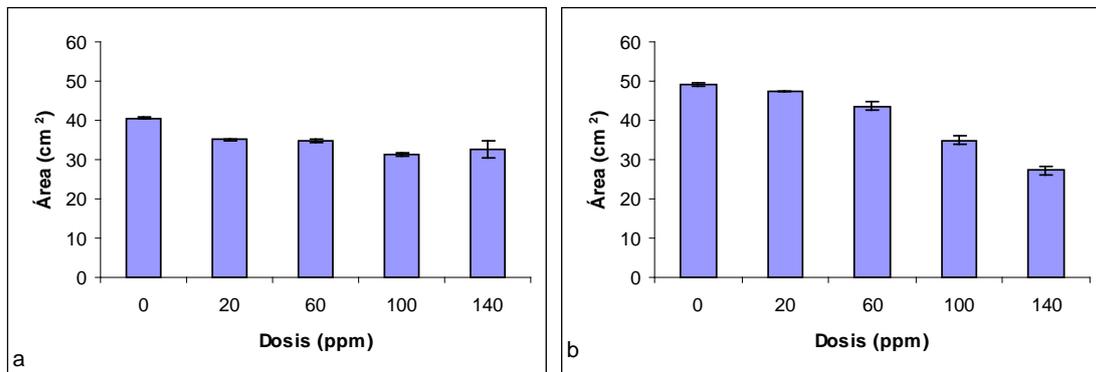


Figura 22: Área de crecimiento de los antagonistas *Trichoderma atroviride* (TME) (a) y *T. harzianum* (T35) (b) testados en cultivos duales con *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, en función de dosis crecientes de sal de isopropilamina. Las barras representan el error estándar de las medias.

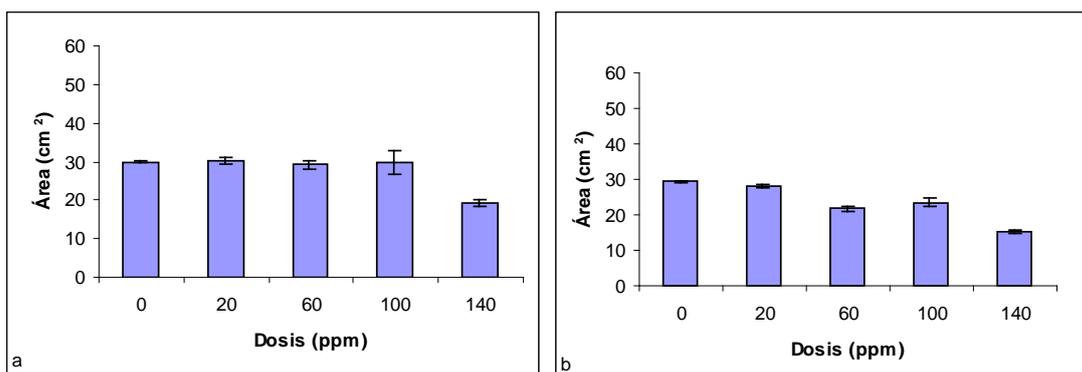


Figura 23: Área de crecimiento de los antagonistas *Trichoderma atroviride* (TME) (a) y *T. harzianum* (T35) (b) testados en cultivos duales con *Fusarium solani*, en función de dosis crecientes de sal de isopropilamina. Las barras representan el error estándar de las medias.

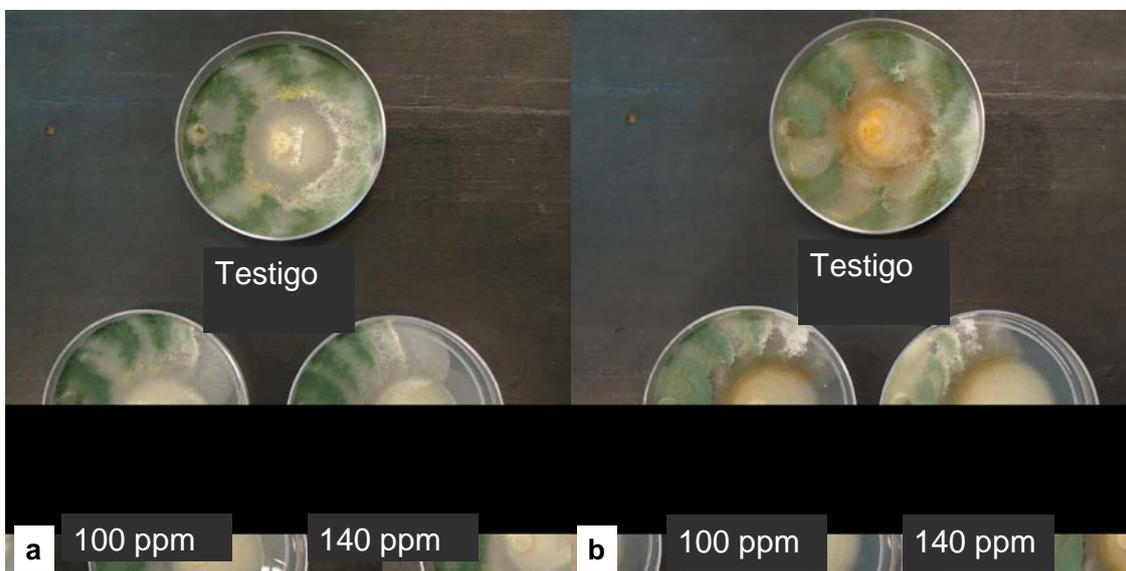


Figura 24: Cultivo dual a) *Trichoderma atroviride* y b) *T. harzianum* vs *Fusarium solani* según dosis crecientes de sal de isopropilamina.

La relación entre el área de las colonias del antagonista y el área de las colonias del patógeno se redujo con dosis crecientes de la sal de isopropilamina para los tres aislados de *Fusarium* spp. evaluados, a excepción de la relación entre *T. atroviride* (TME) y *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*, que no se vio afectada (Figura 25).

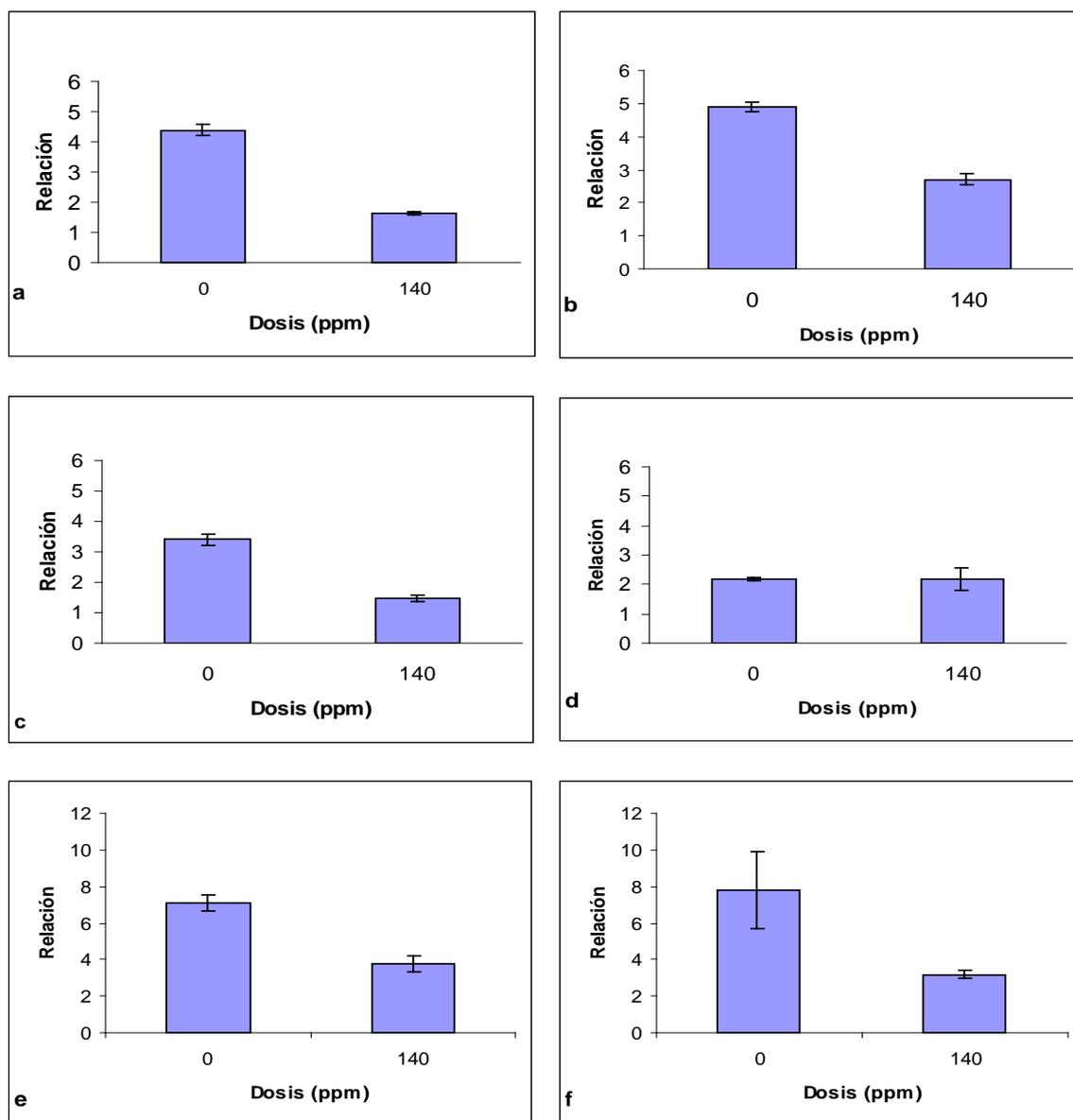


Figura 25: Relación de crecimiento del antagonista vs. el patógeno para la concentración máxima de 140 ppm de sal de isopropilamina vs. testigo sin glifosato. a) *F. solani* vs. *T. harzianum*, b) *F. solani* vs. *T. atroviride*, c) *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* vs. *T. harzianum*, d) *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* vs. *T. atroviride*, e) *F. oxysporum* f. sp. *cepae* vs. *T. harzianum*, f) *F. oxysporum* f. sp. *cepae* vs. *T. atroviride*.

Esta reducción en la relación para el caso de *Fusarium solani* se debe a una reducción inicial del área de crecimiento del antagonista y a un aumento en el área del patógeno. En tanto la reducción en la relación para el caso de *Fusarium oxysporum* se debe a una reducción únicamente del área del antagonista.

4.2.2. *Pythium debaryanum* – *Pseudomonas fluorescens*

Las dosis mayores de glifosato ácido y de sal de isopropilamina no afectaron significativamente la interacción entre *Py. debaryanum* y *Ps. fluorescens*, medida en cm de inhibición (Figura 26). En contraste, dosis crecientes de sal de potasio afectaron la interacción entre *Py. debaryanum* y *Ps. fluorescens*. Los tratamientos testigo, 20 ppm y

60 ppm fueron iguales y se diferenciaron de las dosis 100 ppm y 140 ppm, las que resultaron en valores de inhibición mayores (Figura 27).

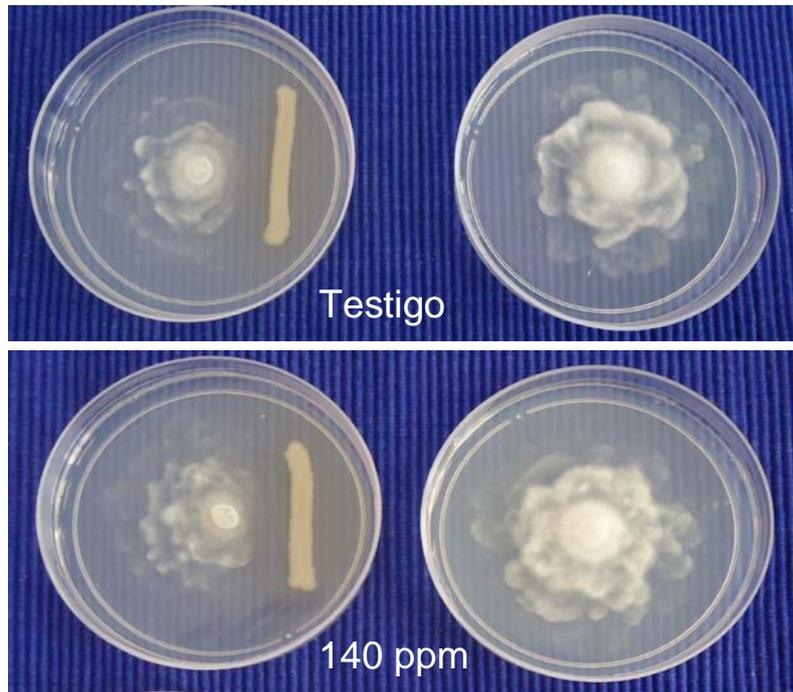


Figura 26: Cultivo dual *Pythium debaryanum* y *Pseudomonas fluorescens* según tratamiento testigo y tratamiento con dosis de 140 ppm de glifosato como ácido.

Cuadro 8: Significancia del efecto de la molécula y la dosis en la inhibición entre *Pythium debaryanum* y *Pseudomonas fluorescens*.

	Molécula	Dosis	Molécula x Dosis
<i>Py. debaryanum</i> / <i>Ps. fluorescens</i>	NS (p=0.08)	**	**

(** p< 0.01)

NS Diferencia no significativa

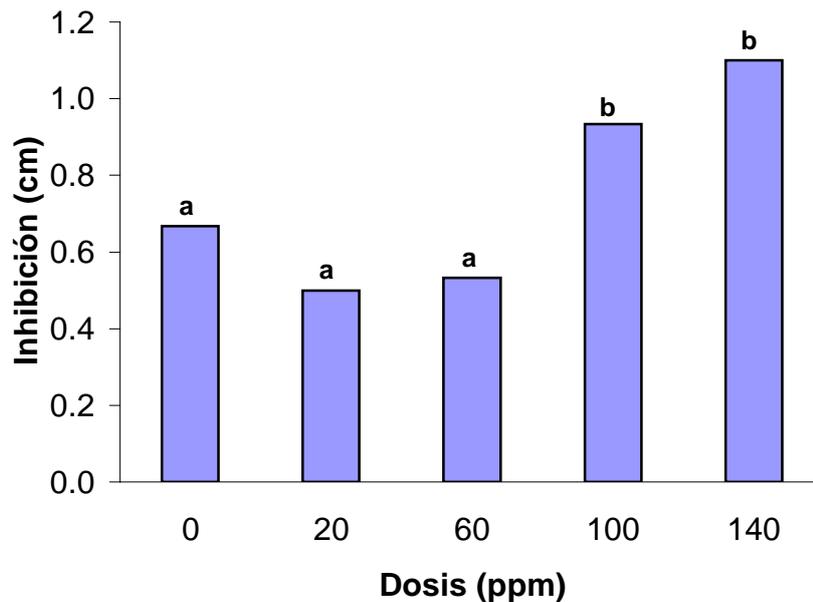


Figura 27. Interacción entre *Pythium debaryanum* y *Pseudomonas fluorescens* según dosis crecientes de sal de potasio. Valores con letras distintas son significativamente diferentes según tests de MDS ($p=0,05$).

4.3. Efecto de dosis crecientes de glifosato ácido sobre la cantidad y madurez de peritecios de *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum* en rastrojo de trigo

Se observó que dosis crecientes de la molécula ácida no afectaron significativamente el número de peritecios sobre los rastrojos, encontrándose un promedio 20 peritecios por rastrojo. A su vez se determinó que dosis crecientes de glifosato ácido no afectaron significativamente la madurez de los mismos. Si bien a los 30 y 60 días de aplicados los tratamientos se observó que el Tratamiento testigo (T0) se diferenció del Tratamiento doble dosis comercial (T4), al final del ensayo (90 días luego de aplicados los tratamientos) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 28). En general la madurez de los peritecios se situó entre 1 (peritecios de color beige inmaduros) y 3 (peritecios de color púrpura a negros, sin presencia de ascas o ascosporas).

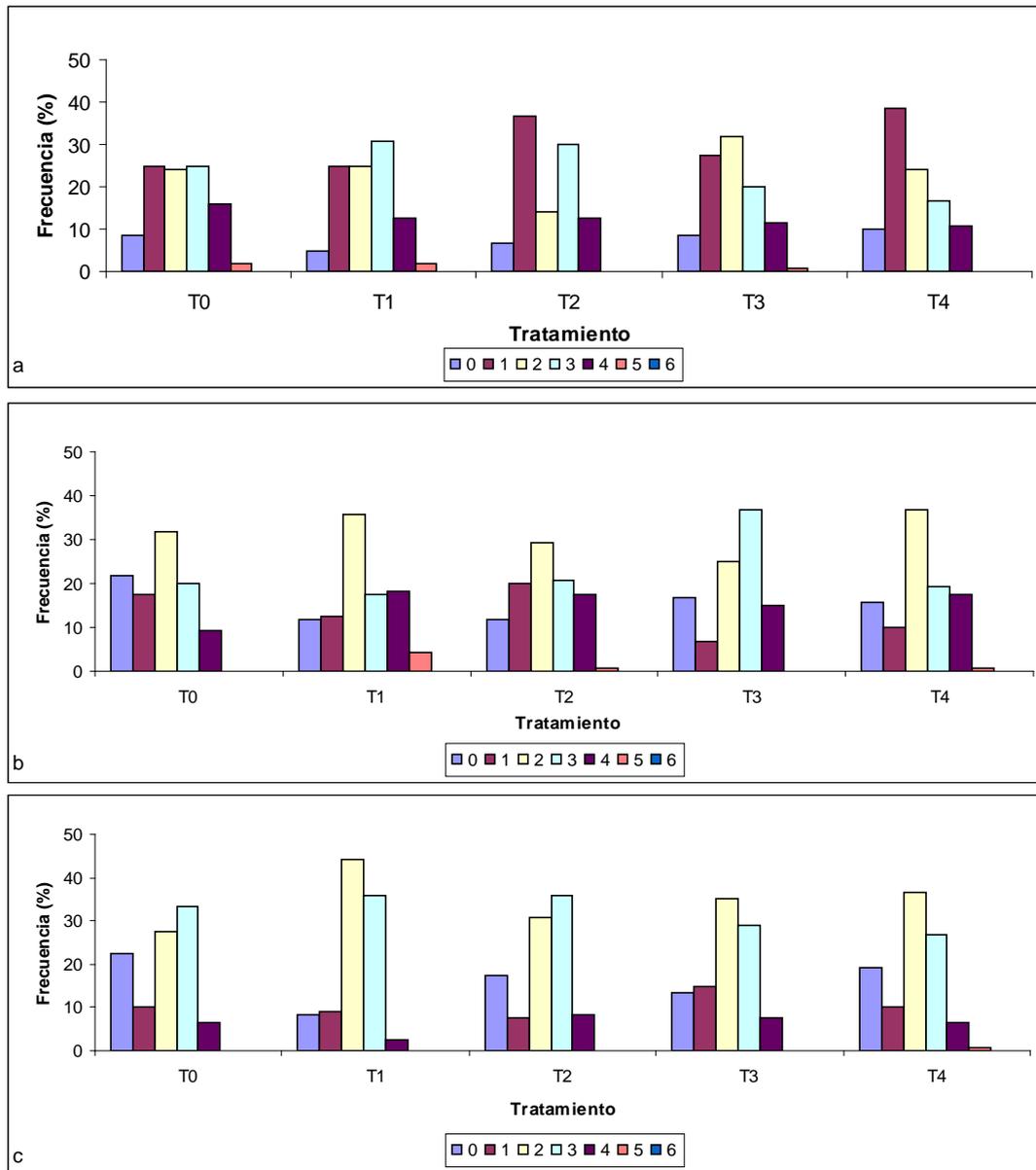


Figura 28. Distribución de frecuencia (%) de estados de madurez de *G. zeae*/ *F. graminearum*, en tres momentos a) 30 días, b) 60 días y c) 90 días luego de aplicados los tratamientos (T0 testigo sin glifosato, T1 sub dosis comercial de glifosato, T2 dosis comercial, T3, dosis comercial en dos momentos consecutivos y T4 doble dosis comercial). Basados en la escala de Paultitz (Bujold *et al.*, 2001) donde 1: peritecios inmaduros beige, 2: peritecios inmaduros azul claro, 3: peritecios purpuras a negros, sin presencia de ascas o ascosporas, 4: peritecios purpuras a negros, con presencia de ascas pero sin ascosporas, 5: peritecios purpuras a negros, con presencia de ascas y ascosporas maduras y 6: peritecios purpuras a negros, sin presencia de ascas, vacías o ascosporas reducidas, 0: corresponde a ausencia de peritecios.

4.4. Ensayos maceteros

4.4.1. Descripción de las parcelas analizadas

4.4.1.1. Análisis de las propiedades físico – químicas (Cuadro 9).

Cuadro 9: Resultados de análisis de las propiedades físico – químicas de los tratamientos CC y ROT.

	Ca meq/100g	Mg meq/100g	K meq/100g	Na meq/100g	A.Tit. meq/100g	C/CpH ₇ meq/100g	Bases T. meq/100g	% Sat Bases	pH (HzO)	C.Org %	N %
CC	15.41	3.78	0.85	0.47	18.60	39.11	20.51	52.44	5.80	3.87	0.27
ROT	13.35	3.19	0.79	0.36	7.50	25.18	17.68	70.22	5.70	3.92	0.24

4.4.1.2. Análisis de residuos

La determinación de glifosato fue de 0.08 ppm para la muestra CC y 0.03 ppm para la muestra ROT y la determinación de AMPA para las muestras CC y ROT fueron 0.58 ppm y 0.32 ppm respectivamente. Para ambas técnicas el límite de detección es de 0.01 ppm.

4.4.1.3. Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos determinados en dos parcelas bajo diferentes tratamientos de sistemas productivos, pertenecientes al ensayo de rotaciones bajo siembra directa, instalado en INIA La Estanzuela, fueron determinados al momento de la toma de la muestra. En general, la parcela CC, bajo sistema de cultivo continuo y alta frecuencia de aplicación de glifosato, presentó valores totales de microorganismos más bajos que la parcela ROT, bajo sistema de rotaciones con pastura. Los valores de UFC/g de suelo de *Pythium* spp. y *Fusarium oxysporum* determinados en la parcela CC fueron mayores que en la ROT. En tanto, los valores de UFC/g de suelo seco de *Pseudomonas* fluorescentes y de *Fusarium* spp. fueron menores en la parcela CC respecto a la ROT. La población inicial de *Trichoderma* spp. presente en ambas parcelas fue igual (Cuadro 10).

Cuadro 10: Densidad poblacional microbiana inicial en la parcela bajo cultivo continuo y bajo rotación con pasturas.

Microorganismos	CC (UFC/g)	ROT (UFC/g)
<i>Fusarium</i> spp.	1500	11000
<i>Fusarium oxysporum</i>	950	440
<i>Pythium</i> spp.	1121	414
<i>Pseudomonas fluorescentes</i>	1856	5361
<i>Trichoderma</i> spp.	240	240

4.4.2. Ensayo macetero en invernáculo

Dosis crecientes de glifosato ácido no afectaron significativamente la densidad poblacional de los diferentes microorganismos estudiados, analizada como ADC (Cuadro 11). Para *Trichoderma* spp. el modelo se ajusta con una probabilidad (P= 0.08).

Dentro del modelo la única fuente de variación significativa fue el factor suelo. La población de *Trichoderma* spp. encontrada en la parcela CC fue mayor que la encontrada en la parcela ROT, correspondiendo a valores promedio de 690 y 165, respectivamente.

Cuadro 11: Significancia del suelo y la dosis en la densidad poblacional de los microorganismos estudiados, analizada como ADC, según ANOVA.

Aislados	Modelo	Suelo	Dosis	Suelo x Dosis
<i>Fusarium</i> spp.	NS (p=0.56)	NS	NS	NS
<i>Fusarium oxysporum</i>	NS (p=0.47)	NS	NS	NS
<i>Pseudomonas fluorescences</i>	NS (p=0.97)	NS	NS	NS
<i>Trichoderma</i> spp.	NS (p=0.08)	**	NS	NS

(** p < 0.01)

NS Diferencia no significativa

5. DISCUSIÓN

En las condiciones en que estos estudios fueron realizados, se determinó que el glifosato afectó negativamente el crecimiento *in vitro* de los distintos microorganismos. Con excepción de *Fusarium solani*, el crecimiento radial tanto de microorganismos patógenos como de los aislados del antagonista *Trichoderma* spp. se vio reducido ante el agregado de glifosato en el medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los encontrados por algunos autores que estudiaron el efecto sobre distintos hongos de suelo (Wardle y Parkinson, 1990c; Meriles *et al.*, 2006). Meriles *et al.* (2006) encontraron un efecto inhibitorio *in vitro* del glifosato (Roundup^(R) Ultra) en el área de las colonias de *F. solani*, *P. ultimum* y *T. viride*. Por su parte, Wardle y Parkinson (1990c) mencionan que *F. oxysporum* redujo su crecimiento radial al evaluarlo en extracto de suelo agar en presencia de glifosato. También Sanogo *et al.* (2000) observaron que dosis crecientes de glifosato (Roundup^(R) Ultra) resultaron en una reducción en el crecimiento radial de *F. solani*.

El glifosato también afectó negativamente el número de UFC de *Pseudomonas fluorescens* evaluado *in vitro* en cultivos puros. Kremer y Means (2009) mencionaron una disminución en las UFC de *Pseudomonas* fluorescentes de la rizósfera con el uso de glifosato. Según un estudio realizado por Schulz *et al.* (1985) las *Pseudomonas* fluorescentes presentaron sensibilidad de la enzima EPSPS al glifosato, resultando en una inhibición de la misma en presencia de éste. Estos autores encontraron que las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes son siempre mayores en la rizósfera de plantas de soja no resistente, mientras que pueden verse reducidas en soja resistente por la susceptibilidad al glifosato exudado hacia la rizósfera (Schulz *et al.*, 1985). Dado el modo de acción del glifosato a través de la inhibición de la enzima EPSPS, clave en la vía biosintética del ácido shikímico, responsable de la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales (Duke *et al.*, 2003a), y que esta vía está presente en los microorganismos (Bentley, 1990), es esperable un efecto detrimental en el crecimiento microbiano.

Si bien algunos autores han observado efectos positivos sobre la actividad microbiana (Haney *et al.*, 2000; Busse *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2003), en este estudio, en ningún caso la presencia de glifosato estimuló el crecimiento radial de los aislados evaluados. Araujo *et al.* (2003) determinaron un incremento significativo de la actividad microbiana de suelo, medida como hidrólisis de fibra detergente ácida (FDA), con el agregado de glifosato. A su vez, estos mismos autores encontraron mayor liberación de dióxido de carbono en presencia de glifosato (molécula ácida, estándar analítico), sugiriendo que los microorganismos del suelo son capaces de utilizar al glifosato como fuente de carbono, y concluyen que el glifosato es degradado por los microorganismos del suelo con la consiguiente formación de AMPA. Así mismo, Wardle y Parkinson (1990a) señalan que la producción de dióxido de carbono está relacionada con la degradación del glifosato en el suelo. Heinonen-Tanski (1989) concluyen que los suelos con mayor actividad microbiana favorecen su rápida degradación.

La utilización de diferentes moléculas o formulados comerciales de glifosato podrían explicar la variabilidad de respuestas encontradas al evaluar el efecto sobre el crecimiento microbiano. Algunos autores adjudican los efectos tóxicos a los coadyuvantes que componen las formulaciones comerciales. En un estudio realizado por Tsui y Chu (2003), se encontró que el orden de toxicidad de las sustancias químicas en

ambientes acuáticos para las bacterias, microalgas, protozoarios y crustáceos fue: el surfactante Polioxietileno-amina (POEA) >Roundup® (41 % i.a.) > glifosato ácido > sal de isopropilamina.

Algunos autores evaluaron el efecto de la molécula ácida (Forlani *et al.*, 1999; Araujo, *et al.*, 2003), mientras que otros trabajaron con algunas de sus sales (Kawate *et al.*, 1992), o formulados comerciales (Sanogo *et al.*, 2000; Meriles *et al.*, 2006). En el presente estudio, al comparar las tres moléculas de glifosato, se observó que la mayor magnitud de reducción en el crecimiento microbiano ocurrió cuando se utilizó la sal de isopropilamina, y la menor fue registrada cuando el medio de cultivo se enmendó con la molécula ácida. En todos los casos, las dosis que resultaron en una mayor inhibición fueron 100 y 140 ppm de i.a.

El glifosato en su forma ácida protonada, es poco soluble. Por esta razón, en el proceso industrial dicha molécula se neutraliza para preparar las soluciones concentradas, base para las formulaciones comerciales. La molécula ácida de glifosato y sus sales se diferencian en su estructura química, siendo la sal de isopropilamina la que presenta mayor peso molecular (sal isopropilamina 228.18, sal de potasio 207.19 y glifosato ácido 169.1, tomado de http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp). En el presente estudio se determinó el pH de la solución de la molécula ácida de glifosato, con concentración de 10.5 g/L, siendo pH 1.5 a diferencia de las sales en solución con igual concentración que presentaron pH 5. Esta diferencia de pH podría explicar la respuesta diferencial al uso de distintas moléculas. Sin embargo, Kawate *et al.* (1992) estudiaron el efecto de la sal de isopropilamina de glifosato en el crecimiento radial de *F. solani* f. sp. *pisi* y determinaron que el glifosato afectó negativamente al *F. solani* independientemente del pH.

De los microorganismos estudiados, *Pythium debaryanum* fue el más afectado por el glifosato como sal de isopropilamina, seguido por los aislados de *Trichoderma* spp. y *F. graminearum*. En tanto, *F. oxysporum* fue el menos afectado. Para las condiciones en que fue realizado este estudio, la velocidad de crecimiento de los microorganismos mencionados fue diferente. Para cubrir el área de la placa de Petri *Pythium* spp. requirió dos días, *Trichoderma* spp. tres días, *F. graminearum* seis días y *F. oxysporum* 15 días.

El efecto directo del glifosato enlenteciendo el crecimiento de microorganismos re-estrategas, tanto patógenos como benéficos, puede traer implicancias en el desarrollo de enfermedades. Por un lado, una disminución en la velocidad de crecimiento del *Pythium* spp. podría demorar el proceso de infección en estadios tempranos de desarrollo de la plántula (Pérez *et al.*, 2010). Sin embargo, se han reportado altas tasas de colonización radicular y aumento en la densidad poblacional de *Pythium* spp., favorecidas por el aporte de sustrato que suministra la muerte de raíces de plantas tratadas con glifosato (Kremer y Means, 2009). Kawate *et al.* (1992) sostienen que *Pythium* y *Fusarium* se ven estimuladas selectivamente por utilizar al glifosato proveniente de exudados radiculares como fuente de energía.

Por otro lado, una disminución de la velocidad de colonización de *Trichoderma* spp. podría resultar en una situación desfavorable para el antagonista, favoreciendo la ocurrencia de enfermedad, al disminuir su capacidad antagónica por competencia, liberación de antibióticos y micoparasitismo (Tronsmo y Hjeljord, 1998). Asimismo, una disminución en la densidad poblacional de *Pseudomonas* fluorescentes en la

rizósfera de soja resistente o un bloqueo de la actividad antagónica causado por el glifosato pueden determinar mayores niveles de enfermedad (Schultz *et al.*, 1985; Wardle y Parkinson, 1992; Kremer y Means, 2009).

El estudio del efecto directo del glifosato sobre el crecimiento microbiano no es suficiente para conocer la resultante en el estado sanitario de los cultivos. La salud de las plantas, entre otros factores, está afectada por la abundancia y virulencia de microorganismos patógenos, por la abundancia y capacidad antagónica de microorganismos benéficos, por factores abióticos y por la interacción entre éstos (Johal y Huber, 2009). En la naturaleza existe un equilibrio dinámico entre dichos factores, que regula el ecosistema. Dada la complejidad del mismo, es necesario evaluar el impacto de cada práctica en las interacciones microbianas que ocurren en el suelo.

Toda práctica agronómica afecta a las comunidades microbianas del suelo y determina diferentes relaciones entre los microorganismos benéficos y patógenos (Garbeva *et al.*, 2004). En particular el uso de herbicidas puede alterar el ecosistema del suelo a través de efectos directos sobre los microorganismos patógenos, antagónicos o micorrízicos (Duncan y Paxton, 1981; Altman y Campbell, 1997). Por esta razón es de gran importancia no sólo determinar los efectos directos sobre cada uno de ellos, sino además sobre su interacción, para lograr una mejor estimación de lo que ocurriría en las comunidades edáficas.

Powell y Swanton (2008) propusieron posibles mecanismos involucrados en promover la proliferación selectiva de algunos microorganismos patógenos en presencia del glifosato, incluyendo la estimulación directa del crecimiento del hongo, la estimulación indirecta debido a la alteración de los componentes de los exudados radiculares, el incremento en la susceptibilidad del huésped y la reducción en la efectividad de los antagonistas.

En el presente estudio, la evaluación de cultivos duales *Fusarium* spp. - *Trichoderma* spp. permitió determinar un efecto inhibitorio mayor del glifosato sobre los aislados antagonistas en relación a los patógenos. Esto se observa al analizar la caída en la variable “relación área antagonista / área patógeno”, cuando se aplicó al medio de cultivo la dosis más alta de glifosato (140 ppm). Estos resultados parecen confirmar que la reducción en la efectividad de los antagonistas es uno de los mecanismos que podrían promover la ocurrencia de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. en condiciones de uso del glifosato (Powell y Swanton, 2008).

Igualmente se observó una respuesta diferencial entre los dos aislados de *Trichoderma* spp. analizados, siendo más sensible la *T. harzianum* T35 en la mayoría de los ensayos. Esta diversidad en la respuesta entre cepas concuerda con la diversidad mencionada por Pérez *et al.* (2011), quienes mencionan que poblaciones de *Trichoderma* spp. evaluadas en sistemas de siembra directa, mostraron alta variabilidad inter e intra-específica en su capacidad antagónica.

En las condiciones en que fueron realizados los cultivos duales de *Py. debaryanum* – *Ps. fluorescens*, el glifosato ácido y sal de isopropilamina no tuvieron efecto sobre la relación de antagonismo, mientras que la sal de potasio determinó un efecto inhibitorio del glifosato sobre el patógeno en relación al antagonista. Esto podría explicarse en base a los mecanismos de antagonismo reportados para la cepa de *Ps. fluorescens* UP 61, a

través de la producción de metabolitos secundarios incluyendo HCN, antibióticos, y proteasas (De la Fuente *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la capacidad de inhibición en placa mediada por dichos compuestos no parece haber sido afectada por la sal de isopropilamina, que sí afectó el número de UFC de *Ps. fluorescens* evaluada en cultivo puro.

Los resultados obtenidos en cultivos duales indican que el glifosato podría afectar la composición de las comunidades microbianas, pudiendo promover el desarrollo de enfermedades en las plantas, a través de la supresión de microorganismos benéficos, lo cual ha sido reportado por otros autores (Altman y Rovira, 1989; Lévesque y Rahe, 1992; Powell y Swanton, 2008).

Uno de los mecanismos sugeridos por Powell y Swanton (2008) que explican el aumento de ocurrencia de enfermedades es la estimulación indirecta debido a la alteración de los componentes de los exudados radiculares en presencia del glifosato. Diversos autores mencionan el aumento de *Fusarium* spp. de la rizósfera (Lévesque *et al.*, 1987; Powell y Swanton, 2008) y el aumento de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. del suelo en respuesta al agregado de glifosato (Sanogo *et al.*, 2000; Sanogo *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007). Cuando la exudación radicular es excesiva, como en los cultivos de soja tratados con glifosato, las infecciones radiculares causadas por los patógenos de suelo se ven aumentadas (Nelson, 1990).

Otro de los mecanismos sugeridos por Powell y Swanton (2008) que explican el aumento de ocurrencia de enfermedades en presencia de glifosato es la alteración en la susceptibilidad del huésped, al inhibir la síntesis de fitoalexinas, compuestos asociados a los mecanismos de defensa de las plantas (Johal y Rahe, 1990). En un sistema bajo siembra directa la presencia del rastrojo en superficie genera condiciones de humedad y bajas temperaturas, lo cual puede ocasionar un enlentecimiento en el desarrollo de la planta, aumentando la susceptibilidad de sus tejidos. Esta situación asociada a una menor velocidad de crecimiento de los microorganismos antagonistas, podría aumentar la ocurrencia de enfermedad (Altier, 2010).

Algunos autores mencionan la influencia de los herbicidas en la disponibilidad de micronutrientes (Huber *et al.*, 2004, Huber *et al.*, 2005), los cuales actúan como activadores o inhibidores de muchas de las funciones fisiológicas claves en las plantas, pudiendo afectar el crecimiento y resistencia a enfermedades (Datnoff *et al.*, 2007). Cambios en la biología del suelo limitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, haciéndolas más susceptible a enfermedades (Huber *et al.*, 2005).

Asimismo, aumentos en la susceptibilidad al síndrome de muerte súbita (Sudden death syndrome -SDS) en soja causado por el complejo *F. solani sensu lato* (O'Donnell *et al.*, 2010) fueron reportados en cultivos de soja transgénicos tratados con glifosato (Sanogo *et al.*, 2000). La severidad de enfermedades causadas por *F. oxysporum* en remolacha azucarera resistente (*Beta vulgaris (saccharifera)* L.) aumentó con aplicaciones de glifosato (Larson *et al.*, 2006). Fernández *et al.* (2009) demostraron que aplicaciones de glifosato 18 a 36 meses previas a la siembra fue el factor agronómico más importante en el desarrollo de enfermedades, principalmente fusariosis de la espiga en cultivos de trigo y cebada.

Para lograr comprender los cambios probables a una escala de mayor complejidad se evaluó la población de diversos microorganismos partiendo de dos parcelas pertenecientes al ensayo de rotaciones bajo siembra directa de INIA La Estanzuela, que presentaban diferencias en cuanto a sistema productivo y frecuencia de uso de glifosato. En el momento del muestreo de suelo en el campo, en la parcela CC, con una secuencia de cultivos continuos con tres aplicaciones de glifosato por año, se encontraron mayores niveles de *F. oxysporum* y de *Pythium* spp. y menores niveles de *Pseudomonas* fluorescentes respecto a la parcela que incluía rotaciones con pradera (ROT). Esto refleja que el uso intensivo del suelo y la frecuencia de aplicaciones de glifosato pueden sostener poblaciones más altas de microorganismos patógenos. En contraste la parcela ROT determinó un balance favorable a los microorganismos benéficos en detrimento de los patógenos. En un estudio realizado por Altier (2003) se observó que los sistemas de agricultura continua se asociaron a valores más altos de índice de patogenicidad del suelo (IPS). En tanto los sistemas con pasturas se asociaron a valores más altos de poblaciones microbianas benéficas (Altier *et al.*, 2010).

Los valores de densidad poblacional de *Trichoderma* spp. fueron iguales para ambos suelos, al momento del muestreo en el campo. Meriles *et al.*, (2006) señalan no haber observado una correlación significativa entre las concentraciones de glifosato y la población de *Trichoderma* spp. En tanto, sí observaron un aumento en las poblaciones de *Fusarium* spp. y *Pythium* spp. con dosis crecientes de glifosato. Así mismo Lévesque *et al.* (1987) señalan que aplicaciones de glifosato resultaron en un incremento en el número de UFC de *Fusarium* spp.

En la parcela ROT se observaron mayores niveles poblacionales de *Fusarium* spp. sin discriminar la composición de patógenos y benéficos, estos valores pueden estar indicando una mayor complejidad y diversidad del sistema, haciéndolo más estable. Al igual que lo reportado por Altier (2003), el mayor número de *Fusarium* spp. fue encontrado en la rotación con pasturas. En dicho estudio a pesar del elevado número de *Fusarium* spp., la implantación de la pastura fue alta, lo que refleja una baja incidencia de *Pythium* spp.

Muchos autores evaluaron el efecto del glifosato sobre las poblaciones microbianas edáficas, destacando un incremento de las poblaciones de varios hongos de suelo (Levesque *et al.*, 1993; Kawate *et al.*, 1997; Descalzo *et al.*, 1998). Sin embargo, en las condiciones en que fue realizado el presente ensayo macetero, no se observaron efectos sobre las poblaciones microbianas al utilizar la molécula ácida de glifosato. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las evaluaciones *in vitro*, que mostraron que la molécula ácida fue la que causó menor efecto sobre las variables estudiadas.

En el ensayo macetero en invernáculo, la estimación del valor poblacional de *Trichoderma* spp., expresado como ADC, fue mayor en la parcela CC respecto a la parcela ROT, presentando a su vez mayor variabilidad. Esto concuerda con lo reportado por Villar *et al.* (2011) quienes observaron mayor población de *Trichoderma* spp. en el sistema de cultivo continuo respecto al sistema de pradera con lotus.

Para las condiciones en que fue realizado el ensayo de *F. graminearum* en rastrojo de trigo, dosis crecientes de la molécula de glifosato ácido no afectaron ni el número ni la madurez de los peritecios, probablemente debido a la baja toxicidad de la molécula ácida.

De la discusión de los resultados obtenidos surge la necesidad de profundizar en el estudio del efecto del uso de glifosato sobre microorganismos patógenos y benéficos, así como sobre su interacción, en sistemas *in vivo*. Ello permitiría, estimar la resultante sobre el estado sanitario de los cultivos, así como definir estrategias de manejo.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo permiten establecer una relación entre el glifosato y dos de los factores primarios que determinan la sanidad de la planta; que son la estimulación de microorganismos fitopatógenos y la reducción en la efectividad de microorganismos antagonistas.

En ningún caso las moléculas de glifosato estimularon el crecimiento de los microorganismos evaluados patógenos y benéficos. En la mayoría de los casos dosis crecientes redujeron el crecimiento microbiano.

El glifosato afectó la interacción entre *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp., observándose un efecto inhibitorio mayor sobre los aislados antagonistas en relación a los patógenos.

De las tres moléculas evaluadas el glifosato ácido fue la que menos afectó el crecimiento microbiano, seguido de la sal de potasio y la sal de isopropilamina, existiendo un gradiente en función de la dosis utilizada.

Suelos con rotaciones con pasturas y menor frecuencia de aplicaciones de glifosato presentaron mayor población de microorganismos, tanto benéficos como patógenos lo cual generaría situaciones más estables, debido a la mayor diversidad microbiana.

En futuros trabajos de investigación, será necesario estudiar el efecto de diferentes formulaciones de glifosato, incluyendo sus coadyuvantes, especialmente POEA, sobre las comunidades microbianas del suelo, particularmente sobre cultivos puros de aislados patógenos y benéficos, y su interacción.

Será oportuno conducir experimentos que incluyan a la planta para evaluar los efectos indirectos del glifosato en la incidencia de enfermedades, a través de la alteración de los componentes de los exudados radiculares y del incremento en la susceptibilidad del huésped.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abawi, G.; Widmer, T.L. 2000. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetables crops. *Applied Soil Ecology* 15:37-47.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th edition. Academic Press. 955 p.
- Altier, N. 2003. Caracterización de la población de *Fusarium oxysporum* y potencial patogénico del suelo bajo rotaciones agrícola ganaderas. Montevideo, INIA. Serie Técnica No.134:37-44.
- Altier, N. 2010. Enfermedades de pasturas. Montevideo, INIA. Serie Técnica N° 183. pp: 19-35.
- Altier, N.; Thies, J.A. 1995. Identification of resistance to *Pythium* seedlings diseases in alfalfa using a culture plate method. *Plant Disease* 79:341-346.
- Altieri, M. 1999. Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. Nordan Comunidad. Montevideo. 338 p.
- Altieri, M. y Nichols, C. 2005. *Agroecology and the search for a truly sustainable agriculture*. 1st. edition. PNUMA. 290 p.
- Altman, J.; Campbell, C.L. 1977. Effect of herbicides on plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 15:361-385.
- Altman, J.; Rovira, A.D. 1989. Herbicide-pathogen interactions in soil-born root diseases. *Plant Pathology* 11:162-166.
- Anderson, J.P.; Domsch, K.H. 1980. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. *Soil Science* 130:211-216.
- Andow, D. 1991. Vegetational diversity and arthropod population response. *Annual Review of Entomology* 36:561-586.
- Aoki, T.; O'Donnell, K.; Homma, Y.; Lattanzi, A.R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex—*F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia* 95:660-684.
- Araújo, A.; Monteiro, R.; Abarkeli, R. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Elsevier Science. Chemosphere, Oxford* 52:799-804.
- Arregui, M.; Lenardon, A.; Sanchez, D.; Maitre, M.; Scoti, R.; Enrique, S. 2003. *Pest Management Science* 60:163.
- Bagnasco, P.; De la Fuente, L.; Gualtieri, G.; Noya, F.; Arias, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 30, N° 10/11, pp. 1317-1322.
- Bajsa, N.; Quagliotto, L.; Yanes, M.L.; Vaz, P.; Azziz, G.; De La Fuente, L.; Bagnasco, P.; Davyt, D.; Pérez, C.; Ducamp, F.; Altier, N.; Arias, A. 2005. Selección de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para controlar enfermedades de implantación en praderas. *Agrociencia*. Vol IX No.1 y No.2:321-325.
- Baker, K.F.; Cook, R.J. 1974. *Biological Control of Plants Pathogens*. Freeman. San Francisco, USA 442 pp.
- Banchero, M. 2003. Determinación de la población de *Fusarium* en el suelo bajo distintos sistemas de rotaciones. Resumen. Simposio 40 años de rotaciones agrícolas – ganaderas. INIA, Serie técnica N° 134. pp. 85-86.
- Bashan, Y.; Holguin, G. 1997. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1225-1228.
- Bentley, R. 1990. The shikimate pathway- a metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25:307-324.

- Bloemberg, G.V.; Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4:343-350.
- Blum, A.; Narbondo, I.; Oyhantcabal, G.; Sancho, D. 2008. Soja transgénica y sus impactos en Uruguay. *La nueva colonización*. Ed. Isabel Cárcamo. 194 p.
- Bolliger, A.; Magrid, J.; Amado, T.J.; Neto, F.S.; Ribeiro, M.F.; Calegari, A.; Ralisch, R.; Neergaard, A. 2006. Taking stock of the Brazilian “zero-till revolution”: a review of landmark research and farmers’ practice. *Advances in Agronomy* 91:47–110.
- Bozzo, A. 2010. Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parámetros Biológicos del suelo. Trabajo de tesis de maestría en Ciencias Ambientales. Universidad de la República – Facultad de Ciencias. pp. 124.
- Bujold, I.; Paulitz, T.C.; Carisse, O. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*. *Plant Disease* 85:977-984.
- Busse, M., Ratcliff, A.; Shestak, C.; Powers, R. 2001. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1777-1789.
- Cabrera, M. 2006. Control biológico de la fusariosis del trigo. In: *Control Biológico de patógeno de plantas*. Facultad de agronomía – Unidad de Educación Permanente. Uruguay Capítulo 8:115-126.
- Cabrera, M. 2009. Control biológico de la fusariosis del trigo. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay.
- Campbell, C.L.; Madden, L.V. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. Wiley and Sons. USA. 532 pp.
- Chiappe, M. 1995. ONG’s, Estado y agricultura sustentable: el caso uruguayo. In: XXth Congreso of the Latin American Sociology Association, 2-6 october, UNAM, Mexico.
- Coupland, D.; Casely, J.C. 1979. Presence of ¹⁴C activity in root exudates and guttation fluid from *Agropyron repens* treated with ¹⁴C-labelled glyphosate. *New Phytologist* 83:17–22.
- Datnoff, L.E.; Elmer, W.H.; Huber, D.M. 2007. *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul, MN.
- De La Fuente, L.; Quagliotto, L.; Bajsa, N.; Fabiano, E.; Altier, N.; Arias, A. 2002. Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 34:545–548.
- De La Fuente, L.; Thomashow, L.; Weller, D.; Bajsa, N.; Quagliotto, L.; Chernin, L.; Arias, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology* 110:671–681.
- Descalzo, R.C.; Punja, Z.K.; Lévesque, C.A.; Rahe, J.E. 1998. Glyphosate treatment of bean seedlings causes short-term increases in *Pythium* populations and damping off potential in soils. *Appl. Soil Ecology* 8:25–33.
- Díaz, R. 2003. 40 años de rotaciones: Introducción a la actividad experimental. Simposio 40 años de rotaciones agrícolas – ganaderas. INIA, Serie técnica N° 134.
- Díaz, R.; Souto, G.; Ferrari, J. 2004. Tecnología y Estructura de Producción. In: *Resúmenes del Simposio Sustentabilidad de la intensificación agrícola en el Uruguay*. INIA, Serie, Actividades de Difusión 365 p.1-6.
- Díaz de Ackermann, M.; Pereyra, S. 2010. Fusariosis de la espiga de trigo y cebada. Seminario de Actualización: Manejo de Enfermedades en Trigo y Cebada. INIA, Serie Actividades de Difusión N°618. pp. 95-110.

- Dogliotti, S. 2003. Exploring options for sustainable development of vegetable farms in southern Uruguay. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 145 p.
- Doran, J.W.; Sarrantonio, M.; Liebig, M.A. 1996. Soil health and sustainability, in: D.L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy*, vol. 56, Academic Press, San Diego, pp 25-37.
- Duke, S.O. 1996. *Herbicide Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Duke, S.O.; Baerson, S.R.; Rimando, A.M. 2003a. Herbicides: glyphosate. In: Plimmer, J.R., Gammon, D.W., Ragsdale, N.N. (Eds.), *Encyclopedia of Agrochemicals*, John Wiley & Sons, New York (Accessed September 12, 2008) <http://www.mrw.interscience.wiley.com/eoa/articles/agr119/frame.html>.
- Duke, S.O.; Rimando, A.M.; Pace, P.F.; Reddy, K.N.; Smeda, R.J. 2003b. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:340–344.
- Duke, S.O.; Powles, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64:319–325.
- Duncan, D.R.; Paxton, J.D. 1981. Trifluralin enhancement of *Phytophthora* root rot of soybeans. *Plant Disease* 65:435-436.
- Durán, A.; García Préchac, F. 2007. *Suelos del Uruguay, Origen, Clasificación, Manejo y Conservación*. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Buenos Aires, Tomo I: 334 p, Tomo II: 358 p.
- Ellis, R.J.; Timms-Wilson, T.M.; Beringer, J.E.; Rhodes, D.; Renwick, A.; Stevenson, L.; Bailey, M.J. 1999. Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96. *Journal of Applied Microbiology* 87:454–463.
- Evans, I.R.; Solberg, E.; Huber, D.M. 2007. Copper and plant disease. In: Datnoff, L.E., Elmer, W.H., Huber, D.M. (Eds.), *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul, MN, pp. 177–188 (Chapter 12).
- Evia, G.; Gudynas, E. 2000. *Agropecuaria y ambiente en Uruguay: valor agregado ambiental y desarrollo agropecuario sustentable*. CLAES Ed., Montevideo, Uruguay, 199 pp.
- EXTOXNET. 1996. Glyphosate. Pesticide Information Profiles. Extension Toxicology Network. Disponible en: <http://www.google.com.uy/search?hl=es&q=EXTOXNET+Roundup&meta=s>.
- Fernández, M. 1992. The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infecting wheat and black oat straw. *Soil Biology and Biochemistry* 24:1031-1034.
- Fernández, M.R.; Jefferson, P.G. 2004. Fungal populations in roots and crowns of common and durum wheat in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26:325–334.
- Fernández, M.R.; Selles, F.; Gehl, D.; DePauw, R.M.; Zentner, R.P. 2005. Crop Production Factors Associated with *Fusarium* Head Blight in Spring Wheat in Eastern Saskatchewan. *Crop Science* 45:1908-1916.
- Fernández, M.R.; Zentner, R.P.; DePauw, R.M.; Gehl, D.T.; Stevenson, F.C. 2007. Impacts of crop production factors on *Fusarium* head blight in barley in eastern Saskatchewan. *Crop Science* 47:1574–1584.
- Fernández, M.R.; Zentner, R.P.; Basnyat, P.; Gehl, D.; Selles, F.; Huber, D. 2009. Glyphosate associations with cereal diseases caused by *Fusarium* spp. In the Canadian Prairies. *European Journal of Agronomy* 31:133-143.

- Fischer, A. 2008. Seminario Internacional “Viabilidad del Glifosato en Sistemas Productivos Sustentables”. Colonia - Uruguay.
- Fomsgaard, I.S.; Spliid, N.H.; Felding, G. 2003. Leaching of pesticides through normal-tillage and low-tillage soil-a lysimeter study. II. Glyphosate. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 38:19-35.
- Forlani, G.; Mangiagalli, A.; Nielsen, E.; Suardi, C. 1999. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 31:991-997.
- Franz, J.E.; Mao, M.K.; Sikorski, J.A. 1997. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. ACS Monograph 189. American Chemical Society, Washington, D.C., USA.
- Frioni, L. 2006. *Microbiología básica, ambiental y agrícola*. Departamento de Biología vegetal, microbiología. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Garbeva, P.; van Veen, J.A.; van Elsas, J.D. 2004. Microbial Diversity in Soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42:243-70.
- García-Préchac, F.; Ernst, O.; Siri-Prieto, G.; Terra, J.A. 2004. Integrating no-till into crop-pasture rotations in Uruguay. *Soil Tillage Research* 77:1-13.
- García Préchac, F. 2003. Propiedades físicas y erosión en los trabajos de larga duración de La Estanzuela. Simposio 40 años de rotaciones agrícolas – ganaderas. INIA, Serie Técnica N° 134. pp. 19-23.
- Geels, F.; Schippers, B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathologische Zeitschrift* 108:193-206.
- Guía Sata. 2011. La guía sata. Disponible en: <http://laguiasata.com/joomla/>. Consultado en: abril 2011.
- Haas, D.; Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology* 3:307-319.
- Handelsman J.; Stabb E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869.
- Haney, R.; Senseman, S.; Hons, E.; Zuberer, D. 2000. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science* 48:89-93.
- Heinonen-Tanski, H. 1989. The effect of temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 21:313-317.
- Höfte, M.; Altier, N. 2010. *Fluorescent pseudomonads* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology* 161 (2010) 464-471.
- Hornby, D.; Bateman, G.L.; Gutteridge, R.J.; Lucas, P.; Osbourn, A.E.; Ward, E.; Yarham, D.J. 1998. *Take-all Disease of Cereals: A Regional Perspective*. CAB International, Wallingford, UK.
- Huber, D.M.; Graham, R.D. 1999. The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases. In: Rengel, Z. (Ed.), *Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implications*. Food Products Press, London, pp. 169-204.
- Huber, D.M.; Leuck, J.D.; Smith, W.C.; Christmas, E.P. 2004. Induced manganese deficiency in GM soybeans. In: Northcentral Fert. Extension Conf., Des Moines, IA, November 2004.
- Huber, D.M.; Cheng, M.W.; Winsor, B.A. 2005. Association of severe *Corynespora* root rot of soybean with glyphosate-killed giant ragweed. *Phytopathology* 95, 45.
- Hultberg, M.; Alsanius, B.; Sundin, P. 2000. In vivo and in vitro interactions between *Pseudomonas fluorescens* and *Pythium ultimum* in the suppression of damping-off in tomato seedlings. *Biological Control* 19:1-8.

- Jenkinson, D.S.; Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. Soil Biochemistry. Eds. E.A. Paul and J.N Ladd. pp 415 – 471. Marcel Dekker Inc, New York and Basel.
- Johal, G.S.; Huber, D.M. 2009. Glyphosate effects on diseases of plants. European Journal of Agronomy 31:144–152.
- Johal, G.S.; Rahe, J.E. 1990. Role of phytoalexins in the suppression of resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum* by glyphosate. Canadian Journal of Pathology 12:225-235.
- Kawate, M.K.; Kawate, S.C.; Ogg, A.G.; Kraft, J.M. 1992. Response of *Fusarium solani* f. Sp. *Pisi* and *Pythium ultimum* to Glyphosate. Weed science 40:497-501.
- King E.; Ward, M; Raney, M. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44:301-307.
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radish. En: Proc. 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Gibert-Clarey, Tours, France. pp. 879-882.
- Komada, H. 1975. Development of a selective médium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Tokyo. Review Plant Protection 8:114-125.
- Kremer, R.J. 2009. Preface. Glyphosate interactions with physiology, nutrition, and diseases of plants: Treta to agricultural sustainability? 31:111-113.
- Kremer, R.J.; Means, N.E. 2009. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. European Journal of Agronomy 31:153-161.
- Krzysko-Lupicka, T.; Orlik, A. 1997. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. Chemosphere 34:2601–2605.
- Krzysko-Lupicka, T.; Sudol, T. 2008. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. Chemosphere 71:1386–1391.
- Larson, R.L.; Hill, A.L.; Fenwick, A.; Kniss, A.R.; Hanson, L.E.; Miller, S.D. 2006. Influence of glyphosate on Rhizoctonia and Fusarium root rot in sugar beet. Pest Management Science 62:182–192.
- Leoni, C. 2003. Enfermedades causadas por hongos y bacterias. Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas em el cultivo de frutilla. INIA Las Brujas, boletín de Divulgación N° 82.
- Leslie, J.; Summerell, B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Australia.
- Lévesque, C.A.; Rahe, J.E.; Eaves, D.M. 1987. Effects of glyphosate on *Fusarium* spp.: its influence on root colonization of weeds, propagule density in the soil, and on crop emergence. Canadian Journal of Microbiology 33:354–360.
- Lévesque, C.A.; Rahe, J.E. 1992. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. Annual Review of Phytopathology 30:579–602.
- Lévesque, C.A.; Rahe, J.E.; Eaves, D.M. 1993. Fungal colonization of glyphosate treated seedlings using a new root plating technique. Mycological Research 97:299–306.
- MacAlady, J.L.; Muller, M.E.; Scow, K.M. 1998. Effects of metam sodium fumigation on soil microbial activity and community structure, Journal of Environmental Quality 27:54–63.
- Martin, F.N.; Loper, J.E. 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology and prospects for biological control. Crit. Review of Plant Science 18:111-181.
- Maas, J. 1998. Compendium of Strawberry Diseases. Fusarium Wilt (Fusarium Yellws). The American Phytopathological Society APS PRESS. Second edition, pp. 52-53.

- MAP Maker. 2010. Disponible en: <http://www.mapmaker.com/download.asp>. Consultado en: agosto 2010.
- Mazzola, M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:557-564.
- Mekwatanakarn, P.; Sivasithamparam, K. 1987. Effect of certain herbicides on soil microbial populations and their influence on saprophytic growth in soil and pathogenicity of the take-all fungus. *Biology and Fertility of Soils* 5:175-180.
- Meriles, J.; Vargas Gil, S.; Haro, R. ; March, G.; Guzmán, C. 2006. Glyphosate and Previous Crop Residue Effect on Deleterious and Beneficial Soil-borne Fungi from a Peanut – Corn – Soybean Rotations. *Journal of Phytopathology* 154:309-316.
- Meyer, J.M.; Abdallah, M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *Journal of General Microbiology* 107:319-328.
- MGAP-DIEA. 2010. En línea: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2010/DIEA-Anuario-2010w.pdf>. Consultado en: abril 2011.
- MGAP – DGSA. 2010. División de Análisis y Diagnóstico. En línea: http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/DivAnalisisDiagnostico/DAYD_PROFIT_ESTAD_ISTICA.htm. Consultado en: abril 2011.
- Mijangos, I.; Becceril, J.; Albizu, I.; Epelde, L.; Garbisu, C. 2009. Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and independent methodologies. *Soil Biology and Biochemistry* 41:505-513.
- Mondino, P.; Vero, S. 2006. Control Biológico de patógeno de plantas. Facultad de agronomía – Unidad de Educación Permanente. Uruguay. pp.158.
- Monteiro, R. 2005. Indicadores da qualidade do solo. *Agrociencia* vol IX: 255-257.
- Morón, A. 2003. Principales contribuciones del experimento de rotaciones cultivos – pasturas de INIA La Estanzuela en el área de fertilidad de suelos (1963-2003). Simposio 40 años de rotaciones agrícolas – ganaderas. INIA, Serie Técnica N° 134. pp. 1-7.
- Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50:715-731.
- Nelson, P.A.; Tousson, T.A.; Marasas, W.F. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park. 193 p.
- Nelson, E.B. 1990. Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant Soil* 129:61-73.
- Neumann, G.; Kohls, S.; Landsberg, E.; Stock-Oliveira Souza, K.; Yamada, T.; Römheld, V. 2006. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *J. Plant Disease Protection* 20:963-969 (Special issue).
- NMP. 2010. Número Más Probable. Disponible en: <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/index.html>. Consultado en: abril 2011.
- O'Donnell, K.; Sink, S.; Scandiani, M.M.; Luque, A.; Colletto, A.; Biasoli, M.; Lenzi, L.; Salas, G.; González, V.; Ploper, L.D.; Formento, N.; Pioli, R.N.; Aoki, T.; Yang, X.B.; Sarver, B.A. 2010. Soybean sudden death syndrome species diversity within North and South America revealed by multilocus genotyping. *Phytopathology* 100:58-71.
- PAN. 2011. Pesticides database – Chemicals. Disponible en: http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp. Consultado en: setiembre 2011.
- Pankhurst, C.E.; Lynch, J.M. 1994. The role of the soil biota in sustainable agriculture. In: *soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems* (C.E. Pankhurst, B.M.

- Doube, V.V.S.R. Gupta and P.R. Grace, eds.) pp. 3-9 Melbourne, Australia: CSIRO Publications.
- Pankhurst, C.E. 1997. Biodiversity of soil organisms as an indicator of soil health. *In*: C.E. Pankhurst and B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta (eds.), Biological indicators of soil health. Chap. 12. CAB Int., U. K., pp. 297-324.
- Pazos, F. 2008. La soja transgénica y su paquete de agrotóxicos. RAP-AL, Uruguay.
- Pereyra, S.A. 2005. Epidemiological and ecological studies on pathogenic *Fusaria* causing Fusarium head blight of wheat and barley in Uruguay. PhD Dissertation. University of Minnesota. St. Paul. 131 p.
- Pereyra, S.; Vero, S.; Garmendia, G.; Cabrera, M.; Pianzolla, M.J. 2006. Diversity of Fungal Populations Associated with Fusarium Head Blight in Uruguay. pp. 35-41. *In*: Ban, T., J.M. Lewis, and E.E. Phipps (eds.) The Global *Fusarium* Initiative for International Collaboration: A Strategic Planning Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico; March 14 - 17, 2006. Mexico, D.F. CIMMYT.
- Pérez, C.; De La Fuente, L.; Arias, A.; Altier, N. 2000. Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia*. Vol.IV No.1:41-47.
- Pérez, C.; Villar, A. 2011. Control biológico en cultivos extensivos: cuando el enfoque condiciona al éxito. Montevideo, INIA. Serie Técnica N° 189. pp. 49-62.
- Pérez, C.; Arias, A.; Altier, N. 2010. Manejo de enfermedades de implantación en leguminosas forrajeras, con especial énfasis en el uso de agentes de biocontrol. Montevideo, INIA. Serie Técnica N° 183. pp: 111–122.
- Pérez, C.; De Lucca, F.; Villar, A.; Pereyra, S.; Vero, S.; Ernst, O.; Altier, N. 2011. Variabilidad inter e intraespecífica en la capacidad antagonica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. ante *Pyrenophora tritici repentis* y *Cochliobolus sativus*. *In*: XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología. I Congreso Nacional de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal. Setiembre 4 – 9, 2011. Piriápolis, Uruguay. Libro de resúmenes. pp. 20.
- Powell, J.R., Swanton, C.J. 2008. A critique of studies evaluating glyphosate effects on diseases associated with *Fusarium* spp. *Weed Research* 48:307–318.
- Pritsch, C. 1995. Variabilidad patogénica en *Fusarium* spp. agente causal del golpe blanco del trigo. FPTA-INIA. Informe final 79 p.
- Quagliotto, L.; Azziz, G.; Bajsa, N.; Vaz, P.; Pérez, C.; Ducamp, F.; Cadenazzi, M.; Altier, N.; Arias, A. 2009. Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control* 51. pp. 42–50.
- Quezado-Duval, A.M.; Gazzoto Filho, A.; Leite Júnior, R.; Camargo, L.E. 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. Asociadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, Brasilia. V. 21, n. 4:670-675.
- Raaijmakers, J.M.; Weller, D.M.; Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 63:881–887.
- Reddy, K.N.; Zablotowicz, R.M. 2003. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. *Weed Science* 51:496–502.
- Ríos, A. 2004. Las comunidades florísticas y su comportamiento ante la intensificación agrícola. *In*: Resúmenes del Simposio Sustentabilidad de la intensificación agrícola en el Uruguay. INIA, Serie Actividades de Difusión 365.p. 31-38.

- Sanogo, S.; Yang, X.B.; Scherm, H. 2000. Effects of Herbicides on *Fusarium solani* f. Sp. *glycines* and Development of Sudden Death Syndrome in Glyphosate-Tolerant Soybean. *Plant Pathology* 90:57-66.
- Sanogo, S.; Yang, X.B.; Lundeen, P. 2001. Field Response of Glyphosate-Tolerant Soybean to Herbicides and Sudden Death Syndrome. *Plant Disease* 85:773-779.
- Schroth, M.N.; Hancock, J.G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:1376-1381.
- Schulz, A.; Krüper, A.; Amrhein, N. 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiology Letters* 28:297-301.
- Schwartz, H.F.; Mohan, S.K. 2008. Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests, Second Edition. APS.
- Sicardi, M.; García Préchac, F.; Frioni, L. 2004. Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 27:125-133.
- Sicardi, M.; Frioni, L.; García Préchac, F. 2005. Monitoreo de la calidad de los suelos del Uruguay: indicadores microbiológicos. *Agrociencia* vol IX: 277-283.
- Simonsen, L.; Fomsgaard, I.S.; Svensmark, B.; Spliid, N.H. 2008. Fate and availability of glyphosate and AMPA in agricultural soil. *Journal of Environmental Science and Health B* 43:365-375.
- Smith, L.; Paul, E.A. 1990. The significance of soil microbial biomass estimations, in: J.M. Bollag, G. Stotzky (Eds.), *Soil Biochemistry*, Dekker, New York, pp 357-396.
- Stewart, S.; Pereyra, S.; Díaz, M. 2004. El efecto de la intensificación agrícola en las enfermedades de los cultivos. *In: Resúmenes del Simposio Sustentabilidad de la intensificación agrícola en el Uruguay*. INIA, Serie Actividades de Difusión 365.p. 19-24.
- Terra, J.A.; García Préchac, F. 2001. Siembra directa y rotaciones forrajeras en las Lomadas del Este: síntesis 1995 – 2000. INIA Treinta y Tres, Serie Técnica N° 125. 100 p.
- Tronsmo, A.; Hjeljord, L. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. In: Boland, G, David, L. Eds. *Plant-Microbe interactions and biological control*. Marcel Dekker, Inc. USA. pp 111-126.
- Tsui, M.; Chu, L. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52:1189-1197.
- Valpassos, M.A.; Cavalcante, E.G.; Cassiolato, A.M.; Alves, M.C. 2001. Effects of soil management systems on soil microbial activity, bulk density and chemical properties, *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 36:539-545.
- van Bruggen, A.H.; Semenov, A.M. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology* 15:13-24.
- van Elsas, J.D.; Garbeva, P.; Salles, J. 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* 13:29-40.
- Villar, A.; Cadenazzi, M.; Ernst, O.; Vero, S.; Pereyra, S.; Altier, N.; Pérez, C. 2011. Efecto de la secuencia de cultivos sobre las poblaciones nativas de *Trichoderma* spp. en sistemas de agricultura sin laboreo. Junio 1-3, 2011. Mar del Plata, Argentina. Segundo Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de resúmenes. pp: 348.
- Walsh, U.F.; Morrissey, J.P.; O’Gara, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology* 12:289-295.

- Wardle, D.; Parkinson, D. 1990a. Soil microbial community structure. *Plant and Soil* 122:29-37.
- Wardle, D.; Parkinson, D. 1990b. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil* 122:21-28.
- Wardle, D.; Parkinson, D. 1990c. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant and Soil* 122:29-37.
- Wardle, D.; Parkinson, D. 1992. The influence of the herbicide glyphosate on interspecific interactions between four fungal species. *Mycology Research* 96:180–186.
- Weller, D.M.; Raaijmakers, J.M.; Gardener, B.B.; Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review Phytopathology* 40:309-348.
- Wells, H. 1988. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: Mukerji, K., Garg, K. Eds. *Biocontrol of plant diseases*. Volume 1. CRC Press. USA. pp. 71-82.
- Williams, J.; Clarkson, J.M.; Mills, P.R.; Cooper, R.M. 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Applied Environmental Microbiology* 69:4190-4191.
- Yanes, M.L.; Fernández, A.; Arias, A.; Altier, N. 2004. Método para evaluar protección contra *Pythium debaryanum* y promoción del crecimiento de alfalfa por *Pseudomonas* fluorescentes. *Agrociencia*. Vol. VIII:23–32.
- Zerbino, S. 2004. Intensificación agrícola: efecto sobre la biodiversidad y la incidencia de insectos plaga In: Resúmenes del Simposio Sustentabilidad de la intensificación agrícola en el Uruguay. INIA, Serie Actividades de Difusión 365. p. 25-30.

ANEXO I
Lista de formulados comerciales de glifosato

FORMULADOS COMERCIALES

Nombre Comercial	Reg. N°	Concentración P.A. (*)	Formulación	Firma Registrante
<i>Isopropilamina</i>				
Atila 48 SC	2920			Calister
Check +	2930			Yalfin
Check D	2450			Yalfin
Check Plus	2445			Yalfin
Eskoba	2910			Mundo Surcos
GeaGlifosato 48 SL	3611			Dapama
Glif	1961			SAUDU
Glifopoint	2293			Maberal
Glifos SL	2299			Proquimur
Glifosato Agrin	3246			AgroInternacional
Glifosato Agrosan	3118			Agar Cross
Glifosato Atanor	2186			Atanor
Glifosato DowAgroSciences	2321			Rutilan
Glifosato DuPont	2495			Agar Cross
Glifosato Proquimur	1965			Proquimur
Glifosato star 480	3357			Solaris
Glifotec	1555			Agritec
Glifotop	2681			Millacar
Glimax	3039			Lage
Glimax Tallow	2885			Lage
Gliserb LS	1465			Tampa
Glyba	2901			Agromil
Glyfosol L 48	1280			Lanafil
Goldenglif 480 CS	2685			Agrom
Helosate	2699			Agro Regional
Improsate	1666			Tafirel
Pampa	2502			SAUDU
Panzer	2449			Rutilan
Rango 480 Cibeles	2468			Cibeles
Ronda Proquimur	1967			Zorbin
Spectrum	3155	360 gr/lit	Concentrado	AgroInternacional
Panzer Gold 3280	3280	680 gr/lit	Soluble	Rutilan
Clipper SG	2833	68%	Gránulos Soluble	Agritec
<i>Potásico</i>				
Gliserb Supra III	3419	600 gr/lit	Concentrado	Tampa
Gliserb Supra LS II	3122	540 gr/lit	Soluble	Tampa

Roundup Full II	2803			Monsanto
Spectrum Plus	3251	524 gr/lit		AgroInternacional
Pampa Premium	3355			SAUDU
Power Rango	3261			Cibeles
Touchdown - IQ	2912	500 gr/lit		Syngenta
Amónico				
Fusta	2766	369 gr/lit	Concentrado Soluble	C. Aroztegui
Roundup Amonio	3045	360 gr/lit	Concentrado Soluble	Monsanto
Gea Glifosato Amonico 75.7 SG	3727			Dapama
Glifosato star WG	3356			Solaris
Glifotec 757 SG	3109			Agritec
Glyfosol Max 75	3009			Lanafil
Gliserb G	3361			Tampa
Goldenglif 75,7 WSG	3609			Agrom
Roundup Ultramax	3062			Monsanto
Improsate Max	3406	68%		Tafirel
Pampa Max 90 WDG	2936	79,9 %		SAUDU
Roundup Formulación Granulada	3036	72%	Gránulos Soluble	Monsanto

ANEXO II

Cálculos de Volumen inicial (mL) para lograr la Concentración final (ppm) deseada de las moléculas a) sal de isopropilamina y b) sal de potasio.

a)

$$\begin{array}{l} 0.105 \times 1.33 = 0.14 \text{ g de sal de isopropilamina} \\ 480 \text{ g} \quad 1000 \text{ mL} \\ 0.14 \text{ g} \quad \quad \quad X = 0.292 \text{ mL} \end{array}$$

b)

$$\begin{array}{l} 0.105 \times 1.204 = 0.126 \text{ g de sal de potasio} \\ 602 \text{ g} \quad 1000 \text{ mL} \\ 0.126 \text{ g} \quad \quad \quad X = 0.21 \text{ mL} \end{array}$$

ANEXO III

Medios de cultivo

KING B

Proteosa peptona N° 3	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
Agar	18 g
Agua deionizada	1 L
Autoclavar y agregar:	
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Glicerol 50%	20 mL
Cicloheximida (Chex)	100 µg/mL
Cloramfenicol (Cm)	12,5 µg/mL
Ampicilina (Ap)	50 µg/mL

KOMADA

K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Fe-Na-EDTA	0,01 g
L-asparagine	2 g
D-galactosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Autoclavar y agregar:	
PCNB 75% WP	1,07 g
Oxgall	0,5 g
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	1 g
Sulfato de streptomina	0,3 g
Ajustar a pH 3.8 +/- 0.2 con una solución de ácido fosfónico al 10%	

PCNB - Peptona pentacloronitrobenzeno agar

Difco peptona N° 3	15 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	
PCNB 75% WP	1 g	
Agar	20 g	
Agua destilada	1 L	
Autoclavar y agregar:		
Sulfato de streptomina	20 mL/L	(5 g en 100 mL de agua destilada)
Sulfato de neomicina	12 mL/L	(1 g en 100 mL de agua destilada)

THSM

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,9 g
NH ₄ NO ₃	1 g
KCl	0,15 g
Rosa bengala	0,15 g
Glucosa	3 g
Agar	20 g
Agua destilada	950 mL

Autoclavar y agregar en 40 mL de agua destilada estéril:

Cloramfenicol	0,25 g
PCNB 75% WP	0,2 g
Previcur	1,2 mL
Sulfato de streptomicina	9 mL

CMA – Cornmeal agar (adaptado de Singleton et al., 1992)

CMA	17 g
Agua destilada	1 L

Autoclavar y agregar:

Ampicillina	0,5 g
Rifampicina (95%)	0,2 g
Pimaricina	0,01 g

Medio de cultivo de grano de soja

Hervir 40 g de granos de soja en agua deionizada durante 25 minutos.
Se filtra y se ajusta a un litro de medio.

Se agregan:

Agar	15 g
------	------