

## Eficacia *in vitro* de fungicidas para el control de *Alternaria alternata* en semillas de amaranto

Noelting, María Cristina Isabel<sup>1</sup> , Subelza, Leandro Franco<sup>1</sup> , Barca, Hernán Javier<sup>1</sup>  y Molina, María del Carmen<sup>1,2</sup> 

1 Universidad Nacional de La Plata, Instituto Fitotécnico de Santa Catalina, Buenos Aires, Argentina.

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
@ mcnoelting@hotmail.com

Recibido: 05/07/2024

Aceptado: 25/02/2025

**Resumen.** En el cultivo de amaranto, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler es el agente causal del tizón foliar y un potencial productor de micotoxinas que afectan la calidad de sus semillas. Con el objetivo de reducir el daño causado por *A. alternata*, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la efectividad de los fungicidas Carboxin (20 % ia)+Thiram (20 % ia) 400, 500 y 600 ppm; Difenconazole (25 % ia) 250, 500 y 700 ppm y Sulfato de cobre pentahidratado (25 %) 250, 500 y 700 ppm sobre el desarrollo micelial y la germinación de los conidios de *A. alternata* y determinar los posibles efectos fitotóxicos de los fungicidas sobre las semillas y plántulas de amaranto. Los resultados obtenidos indicaron que todas las dosis de los fungicidas inhibieron la germinación de los conidios de *A. alternata* entre un 80,13 y 92,54 %, no siendo fitotóxicos para las semillas ni las plántulas. Los tratamientos con Carboxin+Thiram inhibieron el desarrollo micelial entre un 69,45 y 72,30 %. De los tratamientos evaluados se seleccionaron Carboxin+Thiram (500 ppm), Difenconazole (700 ppm) y Sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm) por a) Inhibir el crecimiento micelial de *A. alternata* (>39 %); b) Inhibir la germinación de conidios de *A. alternata* (>82 %); c) Incrementar la germinación de las semillas de amaranto (>21 %); d) Reducir la contaminación de las semillas de amaranto por *A. alternata* (>86 %); e) No ser fitotóxicos para las semillas ni las plántulas de amaranto. Los fungicidas seleccionados podrían utilizarse para reducir el inoculo presente naturalmente en las semillas de amaranto disminuyéndose así el impacto del patógeno en el cultivo.

**Palabras clave:** enfermedad foliar; estrategia; crecimiento micelial; conidios; fitotoxicidad.

### **Abstract. In vitro efficacy of fungicides for control of *Alternaria alternata* on amaranth seeds.**

In amaranth crop, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler is the causal agent leaf blight and a potential producer of mycotoxins that affect the quality of its seeds. With the aim of reducing the damage caused by *A. alternata*, assays were carried out in order to evaluate *in vitro* the effectiveness of Carboxin (20 % ai)+Thiram (20 % ai) 400, 500 and 600 ppm; Difenconazole: (25 % ai) 250, 500 and 700 ppm and Copper sulfate pentahydrate (25 %) 250, 500 and 700 ppm on mycelial development and germination of conidia of *A. alternata*. The results obtained indicate that all fungicide concentrations inhibited the germination of *A. alternata* conidia between 80.13 to 92.54 %. Treatments with Carboxin+Thiram inhibited mycelial development between 69.45 to 72.30 %. Finally, the treatments Carboxin+Thiram (500 ppm), Difenconazole (700 ppm) and Copper sulfate pentahydrate (500 ppm) were selected by: a) To inhibited mycelial growth of *A. alternata* (>39 %); b) To inhibit conidial germination of *A. alternata* (>82 %); c) To increase germination of amaranth seeds (>21 %); d) To reduce seed contamination of amaranth by *A. alternata* (>86 %) and (e) Were not phytotoxic for amaranth seeds and seedlings. Therefore, these results indicate that selected fungicides could be a suitable strategy to reduce the inoculum naturally present in amaranth seeds and therefore reduce the impact of the pathogen on the crop.

**Key words:** foliar disease; strategy; mycelium growth; conidia; phytotoxicity.

## INTRODUCCIÓN

El amaranto es un pseudocereal considerado un cultivo alternativo, que aporta nutrientes en mayor calidad y cantidad que muchos cultivos tradicionales (Sumar Kalinowski, 1993), pudiéndose utilizar como una alternativa para combatir la desnutrición de las personas con menores recursos.

En la provincia de Buenos Aires Matteucci (1998); Jacquelin et al. (2011); Ciocchini (2013) y Del Valle y Del Valle (2017) sugieren cultivar amaranto, como una alternativa rentable para pequeños y medianos productores de zonas marginales.

El amaranto es afectado por agentes bióticos, entre los que se destacan los patógenos

### *Cómo citar este trabajo:*

Noelting, M. C. I., Subelza, L. F., Barca, H. J. y Molina, M. C. (2025). Eficacia *in vitro* de fungicidas para el control de *Alternaria alternata* en semillas de amaranto. *Semiárida*, 35(2), 19-31.

fúngico, teniendo incidencia directa sobre la producción tanto cualitativa como cuantitativa.

Entre las patologías causadas por microorganismos fúngicos se encuentra el tizón foliar, enfermedad endémica en la provincia de Buenos Aires para el cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*, producido por *Alternaria alternata*, patógeno que afecta el vigor de las plantas, la calidad sanitaria y fisiológica de las semillas (Noelting et al., 2016; 2022). En la provincia de Buenos Aires, se han reportado niveles de incidencia del tizón foliar del 40 % en cultivos de *A. cruentus* (Noelting et al., 2004); del 90 % en *A. hypochondriacus* (Noelting et al., 2004) y del 100 % en *A. mantegazzianus* (Noelting, 2023).

En relación al manejo de enfermedades que afectan al cultivo de amaranto existe escasa información sobre el uso de fungicidas específicos para los patógenos que producen una determinada enfermedad (Coca Morante, 2015; Estrada Zúniga et al., 2009). Entre las referencias citadas podemos mencionar los trabajos realizados por Mujica-Sánchez et al. (1997) quienes recomendaron para el control de hongos fitopatógenos la aplicación de Carbendazim (Vitavax), a razón de 2,5 g kg<sup>-1</sup> de semillas, Suquilanda-Valdivieso (2007) sugieren el uso de 2 g kg<sup>-1</sup> de semillade Hidróxido de Cobre o 4 g de ceniza vegetal por kg de semilla y Estrada Zúniga et al. (2009) que utilizaron Carbendazim por vía semihúmeda a razón de 2,5 g kg<sup>-1</sup> de semilla.

Coca Morante (2015) recomienda en la etapa de formación y maduración de las semillas, en zonas endémicas y años húmedos, el uso de fungicidas sistémicos a base de Carbendazim (Piraclostrobina+Metiram, Azoxistrobina+Difenoconazole, etc). Sin embargo, ninguno de los autores hace referencia a fungicidas utilizados para el control de *A. alternata* en el cultivo de amaranto.

*Alternaria alternata* es un contaminante de las semillas (Moreno-Velazquez et al., 2005; Noelting et al., 2004, 2023; Pusz, 2009) y agente etiológico del tizón foliar (Noelting et al., 2004) y del manchado de las semillas (Noelting et al., 2016, 2022).

A su vez, las semillas son una fuente de inoculo y vehículo que facilita su transmisión de *A. alternata* (Simmons, 2007) hasta un valor del 30 % (Noelting, 2023).

En base a los antecedentes mencionados y la falta de investigaciones relacionadas con fungicidas específicos para este patógeno se consideró la posibilidad de analizar estrategias para minimizar el impacto de *A. alternata* en el cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus*.

Los objetivos de la presente investigación fueron: (a) Evaluar la actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial y la germinación de los conidios de *A. alternata* de los fungicidas Carboxin+Thiram (20 %) 400, 500 y 600 ppm; Difenoconazole (25 %) 250, 500 y 700 ppm y Sulfato de cobre pentahidratado (25 %) 250, 500 y 700 ppm; b) Evaluar la capacidad de los fungicidas para disminuir el inoculo de *A. alternata* en semillas y c) Determinar sus efectos en semillas y plántulas de amaranto.

## METODOLOGÍA

Material vegetal: Las semillas de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* Hanelt syn *A. mantegazzianus* Pass. utilizadas fueron obtenidas de un cultivo sembrado en la localidad de Llavallol, provincia de Buenos Aires.

Patógeno: Para la evaluación de los fungicidas in vitro se utilizó una cepa *A. alternata* aislada de semillas de un cultivo de *Amaranthus caudatus* subsp. *mantegazzianus* Hanelt syn *A. mantegazzianus* Pass ubicado en la localidad de Llavallol, pcia de Buenos Aires.

Dicha cepa con capacidad patógena comprobada sobre el follaje de plantas de amaranto, secuenciada por Macrogen está depositada en el cepario del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina bajo el número 2361.

Fungicidas: Se seleccionaron fungicidas con distintos principios activos y modos de acción teniendo en cuenta que tuviesen actividad sobre *Alternaria* spp.

Las concentraciones de los fungicidas a utilizar para el control de *A. alternata*, se determinaron tomando como referencias ensayos realizados en otros cultivos.

En la Tabla 1 se detalla el nombre comercial, principio activo, concentraciones y modo de acción de los fungicidas utilizados.

**Tabla 1.** Nombre comercial, principio activo, modo de acción y concentraciones de los fungicidas utilizados en los ensayos in vitro.

**Table 1.** Trade name, active ingredient, mode of action and concentrations of fungicides uses in the vitro assays.

Fungicidas	Principio activo	A	Concentración (ppm)		
Vitavax flo (SC)	Carboxin+Thiram (20 %)	PC	400	500	600
Bogard (EC)	Difenoconazole (25 %)	PCE	250	500	700
Python (SC)	Sulfato de cobre pentahidratado (25 %)	PC	250	500	700

A: modo de acción; SC: suspensión concentrada; EC: concentrado emulsionable; PC: Preventivo-Curativo; PCE: Preventivo, Curativo, Erradicante. ppm: partes por millón de ingrediente activo. A: Mode of action; SC: Suspension concentrate; EC: Emulsifiable concentrate; PC: Preventive-Curative; PCE: Preventive, Curative, Eradicant. ppm: Parts per million of active ingredient.

### **Variables evaluadas**

#### ***Inhibición del crecimiento micelial de Alternaria alternata***

La efectividad de los fungicidas sobre el crecimiento micelial de *A. alternata* se evaluó tomando como referencia la técnica de envenenamiento por alimentos (Nene & Thapliyal, 1979). Para este propósito se utilizaron soluciones madres de los fungicidas Carboxin+Thiram; Difenoconazole y Sulfato de cobre pentahidratado al 10 % de la formulación comercial y se diluyeron con agua destilada estéril. Para obtener las soluciones de trabajo se tomó 1 ml de la solución madre de cada fungicida de acuerdo a las concentraciones preestablecidas en la Tabla 1.

Los fungicidas según las concentraciones indicadas (Tabla 1) se incorporaron al medio de cultivo (APG 2 %) previo a la solidificación y posteriormente se colocaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Una vez solidificado el medio de cultivo se colocó en el centro de cada placa de Petri un disco de 5 mm de diámetro de APG (2 %) colonizado con *A. alternata*, obtenido del borde de una colonia de siete días de cultivo. Como control se utilizaron placas de Petri que contenían medio APG (2 %) sin fungicidas.

Las placas fueron incubadas en una cámara de crecimiento a 25 °C y un fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento.

A los siete días de incubación se registró el crecimiento de las colonias de *A. alternata* midiendo el diámetro (mm) de ambas diagonales, calculándose la inhibición del crecimiento micelial (IMG) en relación con el control, utilizando la fórmula de Bliss, (1934).

$$PIM(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde:

PIM: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno; C: Diámetro de la colonia del patógeno en el tratamiento control (mm) y T: Diámetro de la colonia del patógeno (mm) en presencia del fungicida.

#### ***Inhibición de la germinación de conidios de Alternaria alternata***

Para evaluar la efectividad de los fungicidas sobre la germinación de los conidios de *A. alternata* (PIG), se agregó a una colonia de siete días de cultivo desarrollada en un medio de APG

(2 %), 10 ml de agua destilada estéril raspándose la parte superior de la misma con una espátula de goma.

La suspensión de conidios se filtró para eliminar los restos de micelio y medio de cultivo. El líquido sobrenadante se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^4$  conidios/ml en una cámara de Neubauer. Esta suspensión se mezcló con cada una de las soluciones de los fungicidas en una relación 1:1 (v/v) y se colocó 0,1 ml de la mezcla resultante en cada una de las tres cavidades del portaobjeto cavado cubriéndolos con un cubreobjeto. Como control se utilizó una suspensión de conidios sin el agregado de fungicida.

Los portaobjetos se colocaron dentro de placas de Petri de 90 mm de diámetro que tenían papel de filtro previamente humedecido y posteriormente se incubaron en una cámara de cultivo a 25 °C y con un fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento. El porcentaje de germinación de los conidios se evaluó a las 6, 12 y 18 h de la incubación observándolos en un microscopio óptico (Carl Zeiss 4033699) analizándose 100 conidios por muestra tomados al azar. Los conidios se consideraron germinados cuando la longitud del tubo germinativo era equivalente a su diámetro (Hocking & Miscamble, 1995).

El porcentaje de inhibición de la germinación de los conidios de *A. alternata* se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PIG (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Donde:

PIG: Porcentaje de inhibición de germinación de conidios; a: Total de conidios germinados en el testigo o control y b: Total de conidios germinados en cada tratamiento.

### ***Efectividad de los fungicidas en semillas de amaranto inoculadas con conidios de Alternaria alternata***

Para evaluar la efectividad de los fungicidas en semillas de amaranto (PIA), se eliminó previamente la contaminación superficial por microorganismos de las semillas tratándolas con una solución de hipoclorito de sodio ( $55 \text{ g cl}^{-1}$ ) al 2 % durante cinco min, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y secaron entre papeles de filtro estériles.

Las semillas desinfectadas se inocularon con una suspensión de conidios de *A. alternata* ( $1 \times 10^4$  conidios/ml) y se secaron entre papeles de filtro estériles y posteriormente se le aplicaron los fungicidas mediante la técnica de inmersión. Para ello, se colocaron 10 g de semillas en cada una de las soluciones de los fungicidas durante 30 minutos, se secaron entre papeles de filtro estériles y sembraron en placa de Petri con 15 ml de medio de APG (2 %), 25 semillas por repetición y 100 semillas por tratamiento, y se incubaron en una cámara de cultivo a 25 °C y 12 h de fotoperiodo durante siete días. El ensayo se realizó según un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento.

Con posterioridad a la incubación se evaluó la incidencia de *A. alternata* y se calculó el porcentaje de inhibición de la contaminación de las semillas para cada tratamiento (PIA) según la siguiente fórmula:

$$\text{PIA (\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

Donde

PIA (%): Porcentaje de inhibición de incidencia de *A. alternata* en semillas; a: Incidencia de *A. alternata* en las semillas control (%) y b: Incidencia *A. alternata* en semillas tratada con fungicida (%).

### ***Determinación de la inocuidad de los fungicidas en semillas y plántulas de amaranto***

Para determinar la inocuidad de los tratamientos con fungicidas se evaluó en las semillas el poder germinativo y en las plántulas el peso seco, largo de la radícula e hipocótilo.

Para evaluar el poder germinativo, las semillas se desinfectaron según la metodología descrita y posteriormente se trataron con cada una de las concentraciones de los fungicidas mediante la técnica de inmersión durante cinco minutos. Las semillas tratadas se sembraron sobre papeles de filtro previamente humedecidos en bandejas (14,5 x 10 x 4,5 cm) a razón de 100 semillas por tratamiento, incubándose en una cámara de cultivo durante siete días a 25 °C y con 12 h de fotoperiodo.

El ensayo se realizó según un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento.

Al finalizar el período de incubación, se evaluó el poder germinativo de las semillas en cada uno de los tratamientos y en las plántulas se registró el peso seco, la longitud radicular y del hipocótilo.

### ***Selección de los fungicidas más efectivos***

Para seleccionar el o los fungicidas más eficaces se tuvo en cuenta el valor máximo de: a) Inhibición de crecimiento micelial de *A. alternata*; b) Inhibición de la germinación de los conidios de *A. alternata*; c) Inhibición de la incidencia de *A. alternata* en semillas tratadas en relación al control y d) La inocuidad de los fungicidas en semillas y en plántulas de amaranto.

### ***Diseño estadístico***

Los tratamientos para cada una de las variables analizadas (siete en total) se distribuyeron según un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por cada tratamiento.

### ***Análisis estadístico***

Los datos se analizaron con el programa estadístico Infostat (Di Renzo et al., 2018). Se utilizó la prueba de Tukey cuando los promedios de los tratamientos de las variables resultaron significativos ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

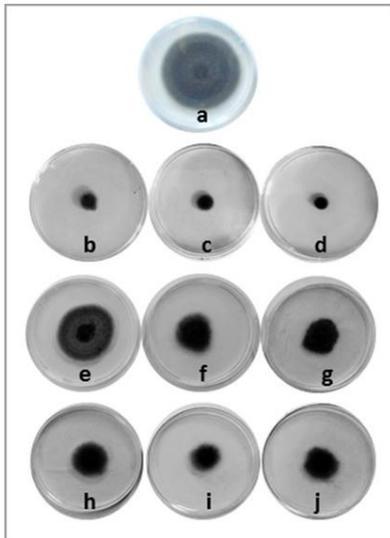
### ***Evaluación in vitro de la efectividad de los fungicidas para el control de Alternaria alternata***

#### ***Desarrollo de las colonias de Alternaria alternata en presencia de fungicidas***

En la Figura 1 se observa el desarrollo de las colonias de *A. alternata*, al séptimo día de incubación, cultivadas en un medio de APG con los fungicidas Carboxin-Thiram 400, 500 y 600 ppm, (Figura 1 b, c, d); Difenoconazole 250, 500 y 700 ppm (Figura 1 e, f, g); y Sulfato de cobre pentahidratado 250, 500 y 700 ppm (Figura 1 h, i, j); en relación a la colonia control cultivada en el mismo medio sin fungicidas (Figura 1a).

En los tratamientos a base de Carboxin +Thiram 400, 500 y 600 ppm, (Figura 1 b, c, d) se registró el menor desarrollo de colonias seguido por los tratamientos a base de Sulfato de cobre pentahidratado 250, 500 y 700 ppm (Figura 1 h, i, j) y Difenoconazole 500 y 700 ppm (Figura 1 f, g) en relación al control (Figura 1a).

Por otro lado, en el tratamiento con Difenoconazole 250 ppm (Figura 1e) se observa un desarrollo similar al del control (Figura 1a).



**Figura 1.** Desarrollo de las colonias de *Alternaria alternata* en medio APG: en ausencia de fungicidas (a) y, en presencia de los fungicidas Carboxin+Thiram 400, 500 y 600 ppm (b, c, d); Difenconazole 250, 500 y 700 ppm (e, f, g) y Sulfato de cobre pentahidratado 250, 500 y 700 ppm (h, i, j).

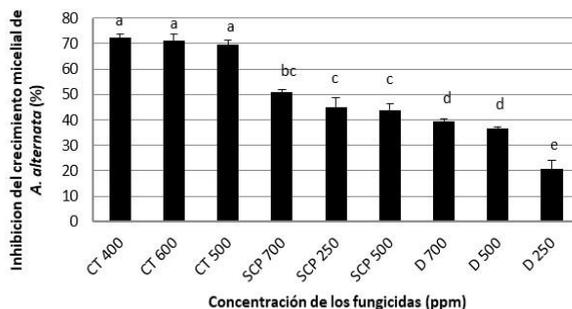
**Figure 1.** Development of *Alternaria alternata* colonies on PDA medium: in the absence of fungicides (a) and in the presence of fungicides Carboxin+Thiram 400, 500 and 600 ppm (b, c, d); Difenconazole 250, 500 and 700 ppm (e, f, g) and Copper sulfate pentahydrate 250, 500 and 700 ppm (h, i, j).

### Inhibición del crecimiento micelial

En la Figura 2 se observan los efectos inhibitorios de los fungicidas Carboxin+Thiram; Sulfato de cobre pentahidratado y Difenconazole sobre el crecimiento micelial de *A. alternata*, oscilando sus valores entre 20,59 y 72,30 %.

Los tratamientos a base de Carboxin+Thiram inhibieron el crecimiento micelial de *A. alternata* con valores superiores al 69 % en todas sus concentraciones, diferenciándose del resto de las concentraciones de los fungicidas Sulfato de cobre pentahidratado y el Difenconazole (Figura 2).

El Sulfato de cobre pentahidratado en sus tres concentraciones (250, 500 y 700 ppm) registró un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *A. alternata* en relación con el Difenconazole (500 y 700 ppm). El tratamiento menos efectivo fue el Difenconazole 250 ppm (20,59 %).



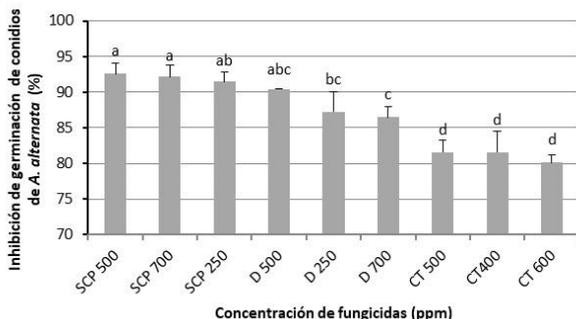
**Figura 2.** Porcentaje de inhibición del desarrollo micelial de *Alternaria alternata* con diferentes concentraciones de los fungicidas Carboxin+Thiram (CT); Sulfato de cobre pentahidratado (SCP) y Difenconazole (D). Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí ( $p>0,05$ ).

**Figure 2.** Inhibition mycelial growth of *A. alternata* (%) by fungicides Carboxin+Thiram (CT); Copper sulfate pentahydrate (CSP) and Difenconazole (D). Means followed by a common letter are not statistically different from each other ( $p>0.05$ ).

### Inhibición de la germinación de los conidios de Alternaria alternata

Todos los fungicidas disminuyeron la germinación de los conidios de *A. alternata* (PIG), con valores superiores al 80 % en relación al control, el cual se consideró con un valor de 0 de eficacia (Figura 3).

Comparando individualmente la efectividad de los fungicidas en sus distintas dosis, se observa que el Sulfato de cobre pentahidratado es el que tiene mayor control de los conidios de *A. alternata* siendo el menos efectivo el Carboxin+Tiram (Figura 3). Resultados similares se obtuvieron a las 12 y 18 h de la incubación (Noelting, 2023).



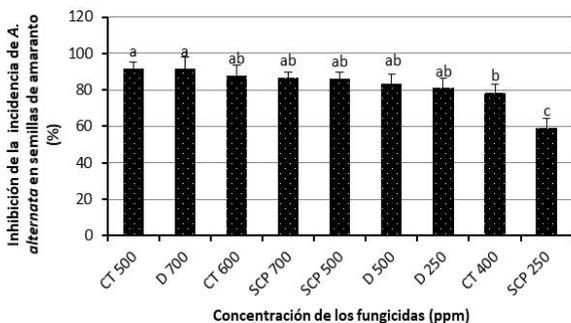
**Figura 3.** Efecto de los fungicidas Sulfato de cobre pentahidratado (SCP); Difenconazole (D) y Carboxin+Thiram (CT) sobre la germinación de conidios de *Alternaria alternata* a las 6 h de incubación. ppm: parte por millón. Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí ( $p > 0,05$ ).

**Figure 3.** Effect of fungicides Copper sulphate pentahydrate (CSP), Difenconazole (D) and Carboxin+Thiram (CT), on the conidial germination of *A. alternata* (%) after 6 h of incubation. ppm: part per million. Means followed by a common letter are not statistically different from each other ( $p > 0.05$ ).

### Efectos de los fungicidas en semillas de amaranto previamente inoculadas con conidios de *Alternaria alternata*

En la Figura 4 se observa que los fungicidas redujeron la contaminación de las semillas previamente inoculadas con una suspensión de conidios de *A. alternata* variando el porcentaje de reducción entre un 59,40 y 91,78 %.

Los fungicidas evaluados, con excepción del Sulfato de cobre pentahidratado (250 ppm) redujeron el porcentaje de incidencia de *A. alternata* en las semillas en más de un 78 % (Figura 4).



**Figura 4.** Inhibición de la incidencia de *Alternaria alternata* en semillas de amaranto tratadas con los fungicidas Carboxin+Thiram (CT), Sulfato de cobre pentahidratado (SCP) y Difenconazole (D). Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí ( $p > 0,05$ ).

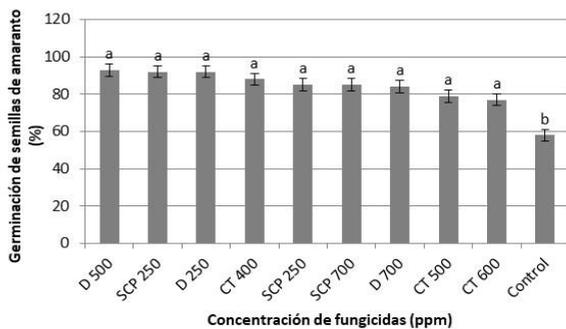
**Figure 4.** Inhibition of the incidence of *Alternaria alternata* on amaranth seeds treated with fungicides Carboxin+Thiram (CT), Copper sulfate pentahydrate (CSP) and Difenconazole (D). Means followed by a common letter are not statistically different from each other ( $p > 0.05$ ).

### Determinación de la inocuidad de los fungicidas

Efectos de los fungicidas en la germinación de semillas de amaranto

Los tratamientos con fungicidas incrementaron la germinación de las semillas entre un 19 y 35 % en comparación con el control (Figura 5).

El promedio de incremento de la germinación de los tratamientos en relación con el control fue de un 28 %.



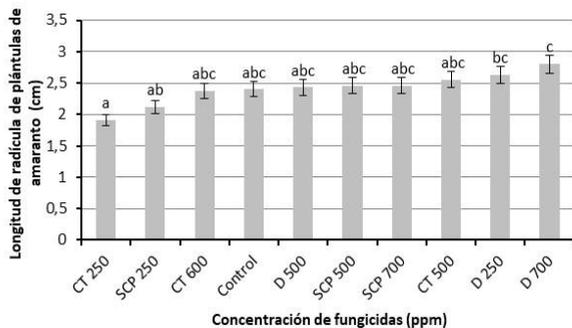
**Figura 5.** Germinación de semillas de amaranto (%), tratadas con los fungicidas Carboxin+Thiram (CT), Sulfato de cobre pentahidratado (SCP) y Difenconazole (D). ppm: parte por millón. Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí ( $p>0,05$ ).

**Figure 5.** Germination of amaranth seeds (%), treated with fungicides Carboxin+Thiram (CT), Copper sulfate pentahydrate (CSP) and Difenconazole (D). ppm: part per million. Means followed by a common letter are not statistically different from each other ( $p>0.05$ ).

### *Efecto de los fungicidas en el largo de la radícula en las plántulas de amaranto*

El tamaño de la radícula de las plántulas de amaranto tratadas con fungicidas (Figura 6), osciló entre 1,9 cm (Carboxin+Thiram 250 ppm) y 2,8 cm (Difenconazole 700 ppm).

No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control, pero sí entre el tratamiento con Carboxin+Thiram 250 ppm y los tratamientos con Difenconazole (250 ppm y 700 ppm), y entre Sulfato de Cobre pentahidratado 250 ppm y Difenconazole 700 ppm (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto de los fungicidas Carboxin+Thiram (CT); Sulfato de cobre pentahidratado (SCP) y Difenconazole (D) sobre la longitud de la radícula de plántulas de amaranto (cm) ppm: parte por millón. Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí ( $p>0,05$ ).

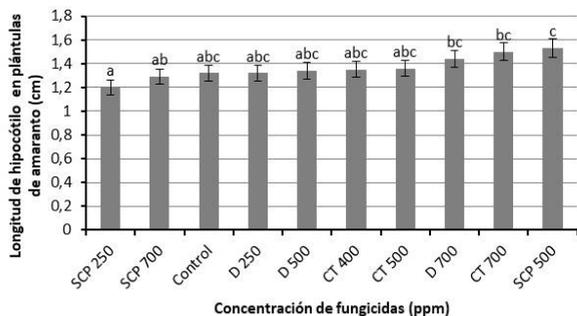
**Figure 6.** Effect of fungicides Carboxin+Thiram (CT), Copper sulfate pentahydrate (CSP) and Difenconazole (D) on the radical length of amaranth seedlings. ppm: part per million. Means followed by a common letter are not statistically different from each other ( $p>0.05$ ).

### *Efectos de los fungicidas en el largo del hipocótilo en plántulas de amaranto*

Con respecto al largo del hipocótilo no hubo diferencias significativas entre el control y los fungicidas, pero sí entre distintas concentraciones del Sulfato de cobre pentahidratado (Figura 7).

Semillas tratadas con Sulfato de cobre pentahidratado (250 ppm) desarrollaron plántulas con un hipocótilo de menor tamaño que las semillas tratadas con Difenocozanole (700 ppm), Carboxin+Thiram (700 ppm) y Sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm).

La longitud del hipocótilo osciló entre 1,20 y 1,53 cm (Figura 7), observándose la mayor longitud en la concentración intermedia de sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm).

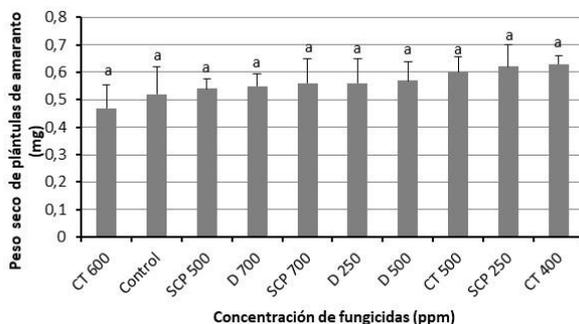


**Figura 7.** Efecto de los fungicidas Carboxin+Thiram (CT); Sulfato de cobre pentahidratado (SCP) y Difenconazole (D) sobre la longitud del hipocótilo de plántulas de amaranto (cm) ppm: parte por millón. Medias seguidas de una letra en común o son estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05).

**Figure 7.** Effect of fungicides Carboxin+Thiram (CT), Copper sulfate pentahydrate (CSP) and Difenconazole (D) on the hypocotyl length of amaranth seedlings (cm) ppm: part per million. Means followed by a letter in common or are statistically different from each other (p>0.05).

### Efecto de los fungicidas en el peso seco de las plántulas de amaranto

El peso seco por plántula varió entre 0,47 a 0,63 mg (Figura 8), no habiendo diferencias significativas entre los tratamientos y el control según la prueba de Tukey.



**Figura 8.** Efecto de los fungicidas Carboxin+Thiram (CT); Sulfato de cobre pentahidratado (SCP) y Difenconazole (D) sobre el peso seco de plántulas de amaranto (mg) ppm: parte por millón. Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05).

**Figure 8.** Effect of fungicides Carboxin+Thiram (CT), Copper sulfate pentahydrate (CSP) and Difenconazole (D) on the dry weight of amaranth seedlings (mg) ppm: part per million. Means followed by a common letter are not statistically different from each other (p>0.05).

### Selección de los tratamientos más efectivos para controlar *Alternaria alternata* en amaranto

En la Tabla 2 se resume las variables que se tuvieron en cuenta para la selección de o de los fungicidas y las concentraciones más efectivas para controlar *A. alternata* en amaranto.

Para esta evaluación no se consideró el peso seco de las plántulas, debido a que no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control.

Fungicidas	cc ( ppm ia)	ICM (%)	IGC (%)	PG (%)	IAI (%)
Carboxin+Thiram	400	72,30 a	81,55 d	88 a	78,42 b
Carboxin+Thiram	500	69,45 a	81,55 d	79 a	91,78 a
Carboxin+Thiram	600	71,28 a	80,13 d	77 a	87,64 ab
Difenconazole	250	20,59 d	87,23 bcd	92 a	80,92 ab
Difenconazole	500	36,49 b	90,45 abc	93 a	83,27 b
Difenconazole	700	39,44 bc	86,52 c	84 a	91,59 a
Sulfato de cobre pentahidratado	250	43,82 b	91,47 ab	92 a	59,40 c
Sulfato de cobre pentahidratado	500	44,90 b	92,54 a	85 a	86,22 ab
Sulfato de cobre pentahidratado	700	50,83 b	92,16 a	85 a	86,70 ab
Control	----	---	---	58 b	---

**Tabla 2.** Variables relativas para seleccionar los fungicidas por su mayor efectividad biológica sobre *Alternaria alternata*. cc: concentración; ppm partes por millón; ia: ingrediente activo; ICM: Inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata*; IGC: Inhibición de la germinación de conidios de *A. alternata* a las 6 h de incubación; PG: Porcentaje de germinación de semillas de amaranto; IAI: Inhibición de la incidencia de *A. alternata* en semillas de amaranto. Las medias seguidas de una letra común no son estadísticamente diferentes entre sí (p>0,05).

**Table 2.** Relative variables used to select fungicides for their biological effectiveness on *Alternaria alternata*. cc: concentration; ppm part per million; ai: active ingredient; IMG: Inhibition mycelial growth of *A. alternata*; ICG: Inhibition conidial germination of *A. alternata* at 6 h of incubation; GP: Germination percentage of amaranth seeds; IAI: Inhibition of *A. alternata* incidence on amaranth seeds. Means followed by a common letter are not statistically different from each other (p>0.05).

Los tratamientos Carboxin+Thiram (500 ppm), Difenconazole (700 ppm) y Sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm) fueron seleccionados por:

- a) Inhibir el desarrollo del micelio de *A. alternata* (valores>39 %).
- b) Inhibir la germinación de los conidios de *A. alternata* (valores>82 %).
- c) Incrementar el poder germinativo de las semillas (valores>21 %).
- d) Disminuir la contaminación de las semillas (valores>86 %).

## DISCUSIÓN

### *Evaluación in vitro de los fungicidas*

#### *Efecto sobre el crecimiento micelial de Alternaria alternata*

Las colonias de *A. alternata* fueron más sensibles al Carboxin+Thiram que al resto de los fungicidas (Figura 2). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Suryawanshi et al. (2018) en cultivos de girasol y por Singh & Rai (2003), en berenjena.

Por otro lado, el Difenconazole (250 ppm) fue el tratamiento menos eficiente para inhibir el crecimiento micelial. En cambio, en la concentración intermedia (500 ppm) y máxima (700 ppm) controló en promedio el crecimiento micelial de *A. alternata* en un 31 % (Figura 2), siendo inferior a lo hallado por Rajput & Chaudhari (2018) que, con concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm obtuvieron una efectividad del 100 % de control en las colonias de *A. alternata* en el tizón de la papa y a Vijayalakshmi, Karuna, & Mahadevaswamy (2018), que con una concentración de 500 ppm controló un 68 % del desarrollo micelial de *A. helianthi*.

La diferencia más notable, con respecto a los resultados obtenidos por Rajput & Chaudhari (2018), es que con la concentración de 50 ppm controlaron el 100 % del desarrollo micelial de *A. alternata* del tizón de la papa y en cambio, en amaranto con 250 ppm la cepa de *A. alternata* solo fue controlada en un 15 % (Figura 2).

#### *Efecto de los fungicidas sobre la germinación de conidios de Alternaria alternata*

Los tres fungicidas inhibieron la germinación de los conidios de *A. alternata* en más de un 80 %, luego de 6 h de incubación (Figura 3).

Los tratamientos a base de Sulfato de cobre pentahidratado tuvieron en promedio el mayor efecto inhibitorio de la germinación de los conidios de *A. alternata* (Tabla 2). Los efectos del sulfato de cobre sobre la germinación de los conidios fueron descritos por Porterfield (2020) quien halló que el átomo de cobre del sulfato de cobre afecta el desarrollo micelial e impide la germinación de las esporas por alterar las membranas celulares, provocando muerte celular.

El Difenconazole en sus tres concentraciones registró un promedio de inhibición de la germinación de los conidios in vitro de *A. alternata* de un 88,06 %, mientras que Rajput & Chaudhari (2018) observaron un 100 % de control de *A. alternata* responsable de las manchas foliares en berenjena. Esto, podría deberse a la capacidad del Difenconazole de inhibir la respiración mitocondrial, impidiendo de esa manera la germinación de las esporas (FRAC, 2016).

Por otro lado, el Sulfato de cobre pentahidratado tuvo menor efecto sobre el desarrollo micelial de las colonias de *A. alternata* y mayor control en la germinación de los conidios.

Los tratamientos a base de Carboxin+Thiram se diferenciaron del resto de los tratamientos por tener mayor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las colonias de *A. alternata* lo cual podría deberse al accionar conjunto de sus principios activos sumándose el principio protector de uno y el sistémico del otro.

En cambio, el Carboxin+Thiram fue el menos eficiente en el control de la germinación de los conidios. En términos generales, los fungicidas evaluados mostraron un comportamiento diferencial en relación a su efecto en el desarrollo de las colonias y la germinación de los conidios de *A.*

*alternata*, siendo más eficientes en controlar la germinación de los conidios que el desarrollo de las colonias.

### ***Efecto de los fungicidas en las semillas de amaranto inoculadas con conidios de Alternaria alternata***

A excepción del tratamiento de Sulfato de cobre pentahidratado (250 ppm), todos los tratamientos redujeron el nivel de incidencia de *A. alternata* en más de un 78 % (Figura 4).

### ***Inocuidad de los fungicidas sobre la viabilidad de las semillas y el crecimiento de las plántulas***

Aunque los fungicidas pueden ser efectivos para controlar a un determinado patógeno o grupos de patógenos se debe tener en cuenta que también pueden afectar la viabilidad de las semillas y/o el crecimiento de las plántulas.

En general, para evaluar sustancias tóxicas en plantas, se emplean variables como la germinación de las semillas y el largo de la radícula (de Souza et al., 2015), debido a que las raíces constituyen el punto de contacto inicial en el crecimiento de la planta y el ingreso de las sustancias a través de ella (Hillis et al., 2011).

Los fungicidas evaluados incrementaron en forma significativa el poder germinativo de las semillas de amaranto, con valores promedios superiores al 28 % en relación al control (Figura 5). El Difenconazole (500 ppm) incrementó la germinación de las semillas de amaranto hasta un 35 % con respecto al control (Figura 5), comprobándose a su vez la inocuidad del mismo.

Estos resultados son coincidentes con los de Nithyameenakshi, Jeyaramraja & Manian (2006) quienes reportaron incrementos en la germinación de las semillas de *Sesamum indicum* y *Phaseolus mungo* al tratarlas con Difenconazole.

Por otro lado, el Sulfato de cobre pentahidratado, incrementó la germinación de las semillas de amaranto siendo a su vez inocuo en las tres concentraciones evaluadas, no habiéndose hallado referencias sobre sus efectos en el poder germinativo de las semillas de amaranto, ni en otras especies vegetales.

Teniendo en cuenta, que *A. alternata* afecta la germinación de las semillas (Noelting et al., 2004; 2016) y sus propágulos pueden hallarse tanto en las cubiertas seminales como en el embrión, inclusive en semillas previamente desinfectadas (Noelting et al., 2016), es posible que los incrementos de germinación en las semillas tratadas con fungicidas se deberían al control de los propágulos del patógeno por los fungicidas aplicados.

En relación al peso seco se lo ha utilizado en diversos cultivos, para determinar el vigor y el efecto de los tratamientos aplicados a las semillas (Buxton et al., 1977; Chinge et al., 1977; Porterfield, 2020; Ries & Everson, 1973).

En el presente estudio, ninguno de los fungicidas en las concentraciones evaluadas afectó el peso seco de las plántulas de amaranto (Figura 8), razón por la cual se consideró que no tendría incidencia en el mismo.

## **CONCLUSIONES**

En base a los resultados obtenidos, los tratamientos más efectivos fueron: Carboxin+Thiram (500 ppm); Difenconazole (700 ppm) y Sulfato de cobre pentahidratado (500 ppm) por inhibir el desarrollo micelial de *A. alternata* y la germinación de los conidios, siendo además inocuos para las semillas y plántulas de amaranto.

Los fungicidas seleccionados serían una alternativa promisoriosa de importancia agrícola para reducir el inóculo presente en semillas de amaranto y por ende disminuir su impacto en el cultivo

En futuros estudios se evaluará el efecto de los fungicidas seleccionados combinados con antagonistas nativos a fin de obtener un mayor control de *A. alternata*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Fitotécnico de Santa Catalina de la Universidad Nacional de La Plata por apoyar la realización del proyecto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buxton, D. R., Melick, P. J., Patterson, L. L., & Godínez, C. A. (1977). Evaluation of seed treatments to enhance pima cotton seedling emergence. *Agronomy Journal*, 69, 672-676.
- Ching, T. M., Hedtke, S., Boulger, M. C., & Kronstad, W. E. (1977). Correlation of field emergence rate and seed vigor criteria in barley cultivars. *Crop Science*, 17, 312-314.
- Ciocchini, F. (2013). Análisis de la factibilidad de la incorporación del cultivo de "amaranto" por parte de horticultores familiares de La Plata y sus alrededores [Tesis de grado], Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Coca Morante, M. (2015). *Enfermedades nuevas y emergentes de granos y tubérculos andinos de Bolivia*. Guía para su identificación y manejo. <https://es.scribd.com/document/323385490/Enfermedades-nuevas-y-emergentes-de-granos-y-tuberculos-andinos-de-Bolivia-Guia-para-su-identificacion-y-manejo>
- De Souza, M., Maia de Oliveira, H. y da Silva, E. (2015). Cadmium toxicity on seed germination and seedling growth of wheat *Triticum aestivum*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*, 37, 499-504
- Del Valle, R. A. y Del Valle P. D. (2017). Estudio ecofisiológico del cultivo de amaranto en La Plata (provincia de Buenos Aires) [Trabajo Final], Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/69375/>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Estrada Zúñiga, R., Gonza Cusipuma, V. y Gutierrez Galdos, J. L. (2009). Guía práctica Plagas y enfermedades del cultivo de Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) PROYECTOS "Especies Olvidadas y Subutilizadas" NUS IFAD II Proyecto Kiwicha 36 p. Consorcio andino. <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/58>
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). (2016). List of Fungicide Common Names. [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-list-of-fungicide-common-names/frac-list-of-fungicide-common-names-\(2016v2\).pdf?sfvrsn=ff7f4a9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-list-of-fungicide-common-names/frac-list-of-fungicide-common-names-(2016v2).pdf?sfvrsn=ff7f4a9a_2)
- Jacquelin, L. M., Llovet, A. y Elisei, J. (2011). El cultivo de amaranto. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. <https://es.scribd.com/document/334254820/El-Cultivo-de-Amaranto>
- Hillis, D. G., Fletcher, J., Solomon, K. R., & Sibley, P. K. (2011). Effects of ten Antibiotics on Seed germination and Root Elongation in Three Plant Species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 220-232.
- Hocking, A. D., & Miscamble, B. F. (1995). Water relations of some Zygomycetes isolated from food. *Mycological Research*, 99, 1113-1118. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0953756209807818?via%3Dihub>
- Matteucci, S. D. (1998). Potencial productivo del amaranto en la pampa ondulada, Argentina: Comportamiento de seis germoplasmas. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*, 15, 560-570.
- Moreno-Velázquez, M., Yáñez-Morales, M. J., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Trinidad-Santos, A. y Arellano-Vázquez, J. L. (2005). Diversidad de hongos en semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23, 111-118.
- Mujica Sánchez, A., Berti Diaz, M. y Izquierdo, J. (1997). *El cultivo del amaranto (Amaranthus spp.): Producción, mejoramiento genético y utilización*. Editorial Puno, Perú. Universidad Nacional del Altiplano (UNA); Chillán (Chile) Universidad de Concepción (UDEC) Roma Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=7223231&pid=S2007-093420100060000500016&lng=e](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=7223231&pid=S2007-093420100060000500016&lng=e)
- Nene, Y. L., & Thapliyal, P. N. (1979). *Fungicides in plant disease control* (2nd ed.). New Delhi, India: Oxford and IBH Publication Co. New Delhi.
- Nithyameenakshi, S.; Jeyaramraja, P. R., & Manian, S. (2006). Investigations on Phytotoxicity of Two New Fungicides, Azoxistrobina and Difenconazole. *American Journal of Plant Physiology*, 1, 89-98. <https://scialert.net/fulltext/?doi=ajpp.2006.89.98>
- Noelting, M. C., Sandoval, M. C. y Abbiati, N. N. (2004). Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de amaranto (*Amaranthus* L.) mediante diversos métodos de análisis. *Revista Peruana de Biología*, 11(2), 169-178.
- Noelting, M. C., Sisterna, M. N., Lovisoló, M., Molla-Kralj, A., Lori, G., Sandoval, M. C., Sulyok, M., & Molina, M. C. (2016). Discoloured seeds of amaranth plant infected by *Alternaria alternata*: physiological, histopathological alterations and fungal secondary metabolites associated. *Journal of Plant Protection Research*, 6(3), 244-249. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0036>

- Noelting, M. C., Sisterna, M. N., Sulyok, M., Abbiati, N. N., & Molina, M. C. (2022). Damage caused by *Alternaria alternata* to the quality and germination of amaranth seeds. *European Journal of Plant Pathology*, 163(1), 193-202. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02468-z>
- Noelting, M. C. I. (2023). Control integrado de *Alternaria alternata* en *Amaranthus mantegazianus* [Tesis de Doctorado], Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/157517>
- Porterfield, A. (2020). Viewpoint: Organic fungicide copper sulfate and other copper products widely used by wine growers endangers humans, animals and insects. <https://geneticliteracyproject.org/2020/07/23/organic-fungicide-copper-sulfate-poses-dangers-to-humans-animals-insects-how-does-it-compare-to-convention>
- Pusz, W. (2009). Fungi from seeds of *Amaranthus* spp. *Phytopathología*, 54, 15-21.
- Rajput, R. B., & Chaudhari, S. R. (2018). Screening of fungicides against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler in vitro condition. *International Journal of Chemical Studies*, 6(4), 971-974.
- Ries, S. K., & Everson, E. H. (1973). Protein content and seed size relationship with seedling vigor of wheat cultivar. *Agronomy Journal*, 65, 884-886.
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria*, An Identification Manual. CBS Fungal Biodiversity Centre. <https://biotanz.landcareresearch.co.nz/references/fd872347-74a7-4b4b-a3fb-7f4bc7228455>
- Singh, K., & Rai, M. (2003). Evaluation of chemicals against *Alternaria* leaf spot of brinjal. *Annals of Plant Protection Sciences*, 11, 394-395.
- Sumar Kalinowski, L. (1993). *La kiwicha y su cultivo*. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas". Cusco, Perú.
- Suquilandá-Valdivieso, M. B. (2007). Producción orgánica del amaranto (Cap. 9) en *Producción Orgánica de Cultivos Andinos* (1-192 p.), UNOCANC Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/mountain\\_partnership/docs/1\\_produccion\\_organica\\_de\\_cultivos\\_andinos.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf)
- Suryawanshi, A. P., Patil, A. C., Anbhule, J. A., Hurule, S. S., & Raner, R. B. (2018). Efficacy of seed dressing fungicides against major seed borne fungi of sunflower. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences Special*, 6, 2521-2526. <https://www.ijcmas.com/special/6/A.%20P.%20Suryawanshi.%20et%20al.pdf>
- Vijayalakshmi, G., Karuna, K., & Mahadevaswamy, G. (2018). Evaluation of microbial bio-control agents and fungicides against *Alternaria helianthi* causing leaf blight of sunflower. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 2726-2730. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.326>