

Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field

Efecto de biocontrol y promoción del crecimiento en maní por *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo

Camila Illa^{1*}, Alejandro Andrés Pérez², Matias Torassa¹, Maria Alejandra Pérez¹, Centro de Transferencia Calidad Agroalimentaria¹, Centro de Transferencia de Bioinsumos²; Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Félix Marrone 746, 5000, Córdoba, Argentina. *Autor para correspondencia: camilailla@agro.unc.edu.ar

Recibido: 29 de Octubre, 2019.

Aceptado: 29 de Noviembre, 2019.

Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. Mexican Journal of Phytopathology 38(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-6

Primera publicación DOI: 13 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 13, 2019.

Resumen. La producción de maní en Argentina sufre severas fluctuaciones debido principalmente al daño provocado por enfermedades fúngicas; su control con productos sintéticos es ineficiente, siendo el control biológico una alternativa de manejo que contribuiría a la sustentabilidad del sistema de producción. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de biocontrol y promoción de crecimiento en maní al inocular *Trichoderma harzianum* CT306 y *Bacillus subtilis* CT104, en condiciones

Abstract. Peanut production in Argentina suffers severe fluctuations, mainly due to fungal diseases and its control with chemical treatments is inefficient, with biological control being a management alternative that would contribute to the sustainability of the production system. This research aimed to evaluate the effect of biocontrol and growth promotion on peanuts by inoculating *Trichoderma harzianum* CT306 and *Bacillus subtilis* CT104 under controlled conditions and field. The tests were carried out in pots with controlled conditions (25 °C, 12 hours light) with peanut seeds Var. Granoleic infected with *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* and *Thecaphora frezzi*. In plants grown to 60 DDS, absence of *A. flavus* and *Fusarium* sp. when applying biological alone and in combination; while the joint application with *T. harzianum* and *Bacillus* caused the absence of *S. minor* and low incidence of *T. frezzi*. In field evaluations, biological treatments increase the emergency percentage (37%) and at

controladas y campo. Los ensayos se realizaron en macetas con condiciones controladas (25 °C, 12 h luz) con semillas de maní Var. Granoleico infectadas con *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* y *Thecaphora frezzi*. En plantas crecidas hasta los 60 DDS, se observó ausencia de *A. flavus* y *Fusarium* sp. al aplicar los biológicos solos y combinados; mientras que la inoculación conjunta de *T. harzianum* y *Bacillus* ocasionó ausencia de *S. minor* y baja incidencia de *T. frezzi*. En las evaluaciones en el campo, los tratamientos con biológicos aumentaron el porcentaje de emergencia (37%) y al final del ciclo se registró reducción del 14% de la incidencia de *T. frezzi*, aumento de biomasa (27%), rendimiento (46%) y tamaño de grano (34%) respecto al testigo, sin afectar el grado de madurez alcanzado.

Palabras clave: *Arachis hypogaea*, rendimiento, Agentes de Control Biológico.

La cadena agroindustrial de maní (*Arachis hypogaea*) en Argentina se ubica fundamentalmente en la provincia de Córdoba y actúa como disparador del desarrollo local. Actualmente, en el sistema de producción de maní, se observa una alta presión de enfermedades fúngicas transportadas por la semilla, como el carbón del maní cuyo agente causal es *Thecaphora frezzi* y Tizón del maní ocasionada por *Sclerotinia minor* (INTA, 2018; Rosso *et al.*, 2018). Esto adquiere una implicancia relevante en la planificación del sistema productivo a largo plazo y con importantes efectos a nivel regional. Si bien, la aplicación de fungicidas sintéticos es la principal herramienta para el control de este tipo de enfermedades, es ineficiente y su uso tiene consecuencias controvertidas sobre el ambiente, la salud humana y el equilibrio en la microbiota edáfica (Andrés *et al.*, 2016). Para

the end of the cycle there was a 14% reduction in the incidence of *T. frezzi*, an increase in biomass (27%), yield (46%) and grain size (34%) with respect to the check, without affecting the degree of maturity reached.

Key words: *Arachis hypogaea*, yield, Biological Control Agents.

The peanut agroindustry chain (*Arachis hypogaea*) in Argentina is located mainly in Córdoba province and can be considered the enabler of local development. Currently, the peanut production system is under high pressure by seed-transported fungal diseases, including peanut smut, whose causal agent is *Thecaphora frezzi*, and peanut blight caused by *Sclerotinia minor* (INTA, 2018; Rosso *et al.*, 2018). This has relevant implications for the long-term planning of the production system and important effects at the regional level. Although the use of synthetic fungicides has been the main tool for controlling this kind of diseases, it has proven to be ineffective, with controversial consequences for the environment, human health and the balance of edaphic microbiota (Andrés *et al.*, 2016). An alternative has emerged to address these limitations by using biocontrol as part of sustainable crop management in order to improve productivity by increasing the availability of nutrients and phytopathogen protection (Sherathia *et al.*, 2016). The products used for biological control are preparations of living or latent cells of microorganisms that, when applied to the soil or seed, favor the plant-rhizosphere relationship (Bashan *et al.*, 2013). So far, there are *in vitro* studies on peanut about the benefits of applying microorganisms (Ankati *et al.*, 2018; Ganuza *et al.*, 2017). According to Bashan *et al.* (2013), the applied biologicals can directly or indirectly influence

atender a estas limitantes surge como alternativa el biocontrol en el marco de un manejo sustentable de los cultivos, con la finalidad de mejorar la productividad a través del incremento en la disponibilidad de nutrientes y la protección a fitopatógenos (Sherathia *et al.*, 2016). Los productos empleados en el control biológico, son preparaciones de células vivas o latentes de microorganismos que aplicados al suelo o a la semilla, favorecen la relación planta-rizósfera (Bashan *et al.*, 2013). Existen hasta el momento, estudios realizados *in vitro* en maní acerca del beneficio al aplicar microorganismos (Ankati *et al.*, 2018; Ganuza *et al.* 2017). De acuerdo a lo propuesto por Bashan *et al.* (2013) los biológicos aplicados pueden influenciar en forma directa o indirecta sobre el crecimiento vegetal al ejercer control sobre los fitopatógenos y además producir efectos promotores del crecimiento vegetal. *Bacillus* es un género bacteriano de amplia distribución en los agro-sistemas (suelo, agua y planta) debido a su habilidad para formar endosporas y su capacidad para producir metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos) (Tejera-Hernández *et al.*, 2011, Villarreal-Delgado *et al.*, 2017). *Bacillus* activa mecanismos de protección en plantas, los cuales incluyen cambios estructurales en la pared celular por acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016) y la producción de flavonoides, fitoalexinas y auxinas (Pretali *et al.*, 2016). En los ensayos realizados por Shifa *et al.* (2016), la aplicación de *B. subtilis* a semillas de maní y al suelo, redujeron significativamente la población de *A. flavus*; mientras que en los granos disminuyó la infección y el contenido de aflatoxina, evidenciando el efecto de *B. subtilis* como agente de control biológico de hongos potenciales generadores de aflatoxinas en maní. *Trichoderma*, es un hongo de amplia distribución, de gran adaptabilidad, fácil reproducción y capacidad antagonica (Sharma y Gothwal, 2017). En particular

plant growth by controlling phytopathogens as well as producing effects that promote plant growth. *Bacillus* is a bacterial genus that is widely distributed in agri-systems (soil, water and plant) because of its ability to form endospores and produce antimicrobial and antifungal metabolites (phenazines, 2,4-diacetylphloroglucinol, cyclic lipopeptides) (Tejera-Hernández *et al.*, 2011, Villarreal-Delgado *et al.*, 2017). *Bacillus* activates protection mechanisms in plants, including structural changes in the cell wall caused by lignin accumulation (Singh *et al.*, 2016) and the production of flavonoids, phytoalexins and auxins (Pretali *et al.*, 2016). In trials conducted by Shifa *et al.* (2016), the results showed that when *B. subtilis* was applied to peanut seed and the soil, the *A. flavus* population decreased significantly, as well as the infection and the aflatoxin content in grain; this showed the effect of *B. subtilis* as a biological control agent of fungi that can produce aflatoxins in peanut. *Trichoderma* is a widely distributed and highly adaptable fungus, of easy reproduction and antagonistic capacity (Sharma and Gothwal, 2017). Particularly in peanut, inoculation with *Trichoderma* promoted plant growth, according to Rojo *et al.* (2017). The proposed objective of this study was to evaluate the biocontrol effect on *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* and *Thecaphora frezzi*, and growth promotion in peanut by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled and field conditions.

The biological controls that were used, *T. harzianum* and *B. subtilis*, were isolated from peanut production plots in Córdoba and identified as CT306 and CT104 strains, respectively; they belong to the collection of Agri-food Quality Transfer Center, Faculty of Agronomy Sciences, National University of Córdoba (FCA UNC). The antagonistic effect of each microorganism was evaluated *in vitro* in

en maní, la inoculación con *Trichoderma* indujo el crecimiento vegetal, de acuerdo a los propuesto por Rojo *et al.* (2017). Se propone como objetivo de este trabajo evaluar el efecto de biocontrol sobre *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia minor* y *Thecaphora frezzi* y la promoción de crecimiento en maní al inocular *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en condiciones controladas y campo.

Los biológicos utilizados *T. harzianum* y *B. subtilis* fueron aislados de lotes de producción de maní de Córdoba e identificados como las cepas CT306 y CT104 respectivamente, y pertenecen a la colección del Centro de Transferencia de Calidad Agroalimentaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba (FCA UNC). El efecto antagonista de cada microorganismo fue evaluado *in vitro* en estudios previos. Se utilizaron semillas de maní Var. Granoleico cosecha 2016/17, provista por la empresa Aceitera General Deheza S.A., General. Deheza, Córdoba, Argentina. En el ensayo en condiciones controladas se evaluó la eficiencia de control de los biológicos en estudio sobre los siguientes patógenos asociados a semillas: *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* y *T. frezzi*. Estos hongos se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Fitopatología, FCA UNC, Argentina. Para la inoculación de las semillas de maní previamente desinfectadas (hipoclorito de sodio 0.3% (v/v) durante 10 minutos y enjuague posterior con agua destilada estéril) con cada fitopatógeno, se lavó superficialmente la placa de cultivo puro con solución salina estéril al 0.9%. La concentración de la suspensión de esporas para *A. flavus* y *Fusarium* sp. fue de 1×10^6 conidios mL^{-1} y de 1×10^5 esclerocios mL^{-1} de *S. minor*. En el caso de *T. frezzi* la inoculación de semillas se realizó recubriéndolas con una suspensión de teliósporas (1 g/25 mL de solución salina estéril). Posteriormente se procedió a la infestación de 100 semillas por peleteo con cada hongo en estudio. El inóculo de *T. harzianum* se obtuvo

previous studies. For the study, peanut seed of the Granoleico variety, 2016/17 harvest cycle, was provided by the company Aceitera General Deheza S.A., General. Deheza, Córdoba, Argentina. A trial under controlled conditions was used to evaluate the control efficiency of the studied biologicals on the following pathogens associated with seeds: *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* and *T. frezzi*. The fungi were obtained from the culture collection of the Phytopathology Laboratory, FCA UNC, Argentina. To inoculate the peanut seeds, which were previously disinfected with 3% (v/v) sodium hypochlorite for 10 min and rinsed with sterile distilled water, the surface of the pure culture plate was washed with a 0.9% sterile saline solution. The concentration of the spore suspension for *A. flavus* and *Fusarium* sp. was 1×10^6 conidia mL^{-1} and 1×10^5 sclerotia mL^{-1} of *S. minor*. In the case of *T. frezzi*, the seeds were inoculated by applying a coat of teliospore suspension (1 g/25 mL of sterile saline solution). Then, using the pelletizing method, 100 seeds were infested with each one of the studied fungus. The *T. harzianum* inoculum was obtained in a malt extract medium for 7 days at 28 °C and 12-h light cycles. The *B. subtilis* inoculum was prepared in an agar-potato-dextrose medium in a rotary stirrer for 48 h at 25 °C.

The biocontrol of each pathogen with the microorganisms was conducted separately, for which pots 30 cm in diameter were filled with a soil:sand (3:1) substrate, previously sterilized in an autoclave (1 hour; 1 atm.). The pots were kept in a chamber at 25 °C and 12-h light photoperiod. The evaluated treatments were: a) the check (seed infected with the pathogen in sterile substrate); b) inoculation with *T. harzianum* (seed infected with the pathogen in a substrate inoculated with *T. harzianum* 1×10^8 conidia mL^{-1} ; 1 L m^3 of substrate); c) inoculation with *B. subtilis* (seed infected with the pathogen and after 24 h inoculated with *B.*

en medio de cultivo de extracto de malta durante 7 días a 28 °C con ciclos de 12 h de luz. Mientras que el de *B. subtilis* fue preparado en medio agar papa dextrosa en agitador rotativo durante 48 h a 25 °C.

El biocontrol de cada patógeno con los microorganismos se llevó a cabo por separado, para lo cual se prepararon macetas de 30 cm de diámetro con sustrato compuesto por tierra: arena (3:1) previamente esterilizado mediante autoclavado (1 hora; 1 atm.). Las macetas se mantuvieron en cámara a 25 °C y fotoperiodo de 12 h de luz. Los tratamientos evaluados fueron: a) Testigo (semilla infectada con patógeno en sustrato estéril); b) inoculación con *T. harzianum* (semilla infectada con patógeno en sustrato inoculado con *T. harzianum* 1×10^8 conidios mL^{-1} ; 1 L m^3 de sustrato); c) inoculación con *B. subtilis* (semilla infectada con patógeno y a las 24 h inoculada con *B. subtilis* 2.5×10^{10} UFC en dosis de 100 mL/100 kg de semillas, en sustrato estéril) y d) inoculación combinada con *T. harzianum* y *B. subtilis* (semilla infectada con patógeno y a las 24 h inoculada con *B. subtilis* y *T. harzianum* en las mismas dosis y concentración de los tratamientos anteriores). El ensayo se condujo en un diseño completamente al azar. Cada unidad experimental estuvo constituida por cuatro macetas por duplicados para cada tratamiento evaluado. El ensayo se repitió completo dos veces. Desde la siembra y hasta los 60 DDS (días después de la siembra) se evaluaron los signos y síntomas de cada enfermedad por observación visual, lupa estereoscópica y microscopio óptico, de acuerdo a la descripción presentada en el Cuadro 1. En función del porcentaje de plantas con signos y síntomas de la enfermedad se establecieron las siguientes categorías de incidencia: nivel bajo= 10% de las plantas; nivel medio= 25% de las plantas, nivel alto= 50% de las plantas y ausencia= 0% de las plantas. En todos los casos donde se detectó enfermedad se realizó un aislamiento e identificación morfológica para la confirmación del patógeno.

subtilis 2.5×10^{10} UFC using doses of 100 mL/100 kg of seeds, in sterile substrate); and d) inoculation with a combination of *T. harzianum* and *B. subtilis* (seed infected with the pathogen and after 24 h inoculated with *B. subtilis* and *T. harzianum* using the same doses and concentration of the previous treatments). The trial was arranged in a completely randomized design. Each unit of the experiment consisted of four pots per duplicates for each evaluated treatment. The trial was repeated twice. From sowing and up to 60 DAS (days after sowing), the signs and symptoms of each disease were observed, visually and with a stereoscope and an optical microscope, according to the description shown in Table 1. Based on the percentage of plants showing disease signs and symptoms, the following incidence categories were established: low level= 10% of plants; intermediate level= 25% of plants; high level= 50% of plants; no signs or symptoms= 0% of plants. In all cases where the disease was detected, isolation and morphological identification were conducted to confirm the pathogen.

In the field, the seeds were sown in the Peanut Module of the FCA UNC Field-School (31° 28' 49.42" S and 64° 00' 36.04" W), Córdoba, Argentina. The evaluated treatments were: a) control (untreated seed); b) fungicide (pre-treatment with Metalaxil-M 1.0 g/Fludioxonil 2.5 g; 750 cc/100 kg seed); c) fungicide + *T. harzianum* (pre-treatment with fungicide + pre-inoculation with *T. harzianum* 1×10^8 viable conidia mL^{-1} ; 200 mL/100 kg seed + adhesive); d) fungicide + *B. subtilis* (pre-treatment with fungicide + pre-inoculation with *B. subtilis* (2.5×10^{10} UFC/L; 100 mL/100 kg seed); and e) fungicide + *T. harzianum* + *B. subtilis* (pre-treatment with fungicide + pre-inoculation with *T. harzianum* and *B. subtilis* at the same dose and concentration as in the previous treatments). Each treatment was sown rows 100 m long separated by a distance of 70 cm and a distribution of 14 seeds per linear meter. Each treatment was arranged in a completely

Cuadro 1. Descripción de signos y síntomas tenidos en cuenta para la categorización de plantas enfermas de maní en condiciones controladas
Table 1. Description of the signs and symptoms to classify infected peanut plants under controlled conditions.

Enfermedad	Signos y síntomas
<i>Aspergillus flavus</i>	A la emergencia lesiones necróticas en cotiledones. Presencia de micelio en la unión de cotiledones con hipocótilo.
<i>Fusarium</i> sp.	Marchitamiento de rama principal y hojas. Manchas oscuras en raíz principal con presencia de micelio y macroconidios en área vascular.
<i>Sclerotinia minor</i>	Pérdida de turgencia de ramas y hojas. Presencia de micelio algodonoso pulverulento en la base de la planta. Presencia de esclerocios negros pequeños.
<i>Thecaphora frezzi</i>	Presencia de micelio dicariótico en ginóforos.

En el campo, la siembra se realizó en el Módulo Maní del Campo Escuela de la FCA UNC (31° 28 49.42" S y 64° 00 36.04" O) Córdoba, Argentina. Los tratamientos evaluados fueron: a) Testigo (semilla sin tratamiento); b) Fungicida (Pretratado con Metalaxil-M 1.0 g/Fludioxonil 2.5 g; 750 cc/100 kg semilla); c) Fungicida + *T. harzianum* (Pretratado con fungicida + Preinoculación con *T. harzianum* 1 x 10⁸ conidios viables mL⁻¹; 200 mL/100 kg semilla + adherente); d) Fungicida + *B. subtilis* (Pretratado con fungicida + Preinoculación con *B. subtilis* (2.5 x 10¹⁰ UFC/L; 100 mL/100 kg semilla); e) Fungicida + *T. harzianum* + *B. subtilis* (Pretratado con fungicida + Preinoculación con *T. harzianum* y *B. subtilis* en las mismas dosis y concentración de los tratamientos anteriores). Se sembraron cuatro surcos de 100 m de longitud para cada tratamiento distanciados entre ellos 70 cm, con una distribución de 14 semillas por metro lineal. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Los datos fueron relevados de acuerdo a un muestreo aleatorio sobre los dos surcos centrales de todas las plantas en 1 m². Las variables evaluadas fueron: porcentaje de plantas emergidas a los 28 DDS, crecimiento de plantas medido como peso seco (PS) a los 30 y 165 DDS (Pérez y Arguello, 1995). Al final del ciclo

randomized design with four replications. The data were collected by randomly sampling all the plants from the two central rows in 1 m². The evaluated variables were percentage of emerged plants at 28 DAS, plant growth measured as dry weight (DW) at 30 and 165 DAS (Pérez and Arguello, 1995). At the end of the cycle (165 DAS), each replication of each treatment was manually harvested to determine the level of maturity, according to the husk scraping method (Pérez *et al.*, 2004), percentage of husks infected with *T. frezzi* (March and Marinelli, 2005), husk and grain yield (qq/ha) and grain quality as the percentage of confectionery grains corresponding to 38/42, 40/50, 50/60 and 60/70 grains per ounce. The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA), after validating the variance homogeneity assumption using Levene's test ($\alpha = 0.05$). The means were compared using the LSD test ($p \leq 0.05$) with the InfoStat statistical software (Di Rienzo *et al.*, 2018).

According to the results shown in Table 2, under controlled conditions the treatments with *T. harzianum* and *B. subtilis*, alone and combined, showed no *Fusarium* sp., while *S. minor* showed a low level of incidence when the antagonist was individually applied, and no disease symptoms were observed when the treatments were

(165 DDS) se procedió a la cosecha manual de cada repetición en cada tratamiento para poder determinar: grado de madurez de acuerdo al método de raspado de vaina (Pérez *et al.*, 2004), porcentaje de infección de vainas con *T. frezzi* (March y Marine-lli, 2005), rendimiento de vainas y granos (qq/ha) y calidad granométrica como porcentaje de granos confitería correspondientes a 38/42, 40/50, 50/60 y 60/70 granos por onza. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), previa validación del supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene ($\alpha = 0.05$). La comparación de medias se realizó mediante test LSD ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

De acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 2, en condiciones controladas los tratamientos con *T. harzianum* y *B. subtilis* de forma individual y combinados, mostraron ausencia de *Fusarium* sp., mientras que *S. minor* mostró nivel de incidencia bajo con la aplicación de los antagonista de forma individual y ausencia de la enfermedad al inocularlos de manera combinada. El control

combined. The *T. frezzi* control was more effective when the biocontrols were combined (Table 2). However, when the biocontrols were applied alone, *T. harzianum* had better control than *B. subtilis*. These results coincide with the results of Rojo *et al.* (2007), who by applying *T. harzianum* ITEM 3636 on peanut seeds effectively controlled *F. solani*. The authors state that this biocontrol proved to be an efficient and competitive microorganism in the rhizosphere. The effect observed when *Trichoderma* is used could be related to complex mechanisms possibly associated with the degradation of the fungal walls, according to Howell (2003), Harman *et al.* (2004) and Woo *et al.* (2006).

Preliminary evaluations in which peanut was inoculated with *B. subtilis* showed effective control of fungi associated with seed (Illa *et al.*, 2013). In the results shown in Table 2, it must be highlighted that the growth of the *A. flavus* fungus was inhibited when *B. subtilis* was inoculated in peanut. Similar results were obtained by Shifa *et al.* (2016), who reported they inhibited the growth of *A. flavus* by 93-100% in dual crop trials and reduced the

Cuadro 2. Nivel de incidencia de hongos fitopatogénicos en maní en ensayos en condiciones controladas.

Table 2. Level of incidence of phytopathogenic fungi in peanut trials under controlled conditions.

Tratamientos	Hongos fitopatogénicos			
	<i>A. flavus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>S. minor</i>	<i>T. frezzi</i>
Testigo semilla infectada en sustrato estéril	XXX	XXX	XXX	XXX
<i>Trichoderma</i> en sustrato	-	-	X	X
<i>Bacillus</i> en semilla	-	-	X	XX
<i>Trich. + Bacillus</i> sustrato semilla	-	-	-	X

Nivel de incidencia Bajo: X (10% plantas); Medio: XX (25% plantas); Alto: XXX (50% plantas); Ausencia: -(0% plantas) / Level of incidence Low: X (10% of plants); Intermediate: XX (25% of plants); High: XXX (50% of plants); No fungi: - (0% of plants).

de *T. frezzi* fue más eficiente al aplicar los biocontroladores de manera combinada (Cuadro 2). Sin embargo, al aplicarlos de manera individual se observó que *T. harzianum* presentó mejor control que *B. subtilis*. Estos resultados coinciden con lo observado por Rojo *et al.* (2007) quienes al aplicar *T. harzianum* ITEM 3636 en semillas de maní, lograron un efectivo control de *F. solani*. Estos autores sostienen que el biológico incorporado resultó ser un microorganismo eficiente y competitivo en la rizósfera. El efecto registrado al aplicar *Trichoderma* estaría relacionado a complejos mecanismos posiblemente asociados a la degradación de las paredes del hongo de acuerdo a lo propuesto por Howell (2003), Harman *et al.* (2004) y Woo *et al.* (2006).

En maní, evaluaciones preliminares inoculando *B. subtilis*, demostraron un eficiente control de hongos asociados a semillas (Illa *et al.*, 2013). En los resultados presentados en el Cuadro 2, se debe destacar la inhibición del crecimiento del hongo *A. flavus* por la inoculación con *B. subtilis* en maní. Resultados similares fueron encontrados por Shifa *et al.* (2016) quienes reportaron inhibición del crecimiento de *A. flavus* del 93 al 100% en ensayos de cultivo dual y la disminución en los porcentajes de infección en ensayos de invernáculo y campo. Estos autores resaltan la importancia de la aplicación de *Bacillus* para lograr disminuir la presencia de este hongo potencial generador de aflatoxina, lo que representa un aporte a la producción de maní inocuo.

En los ensayos de campo la emergencia de plantas a los 28 DDS (Cuadro 3) para todos los tratamientos aplicados, fue mayor respecto al Testigo ($p \leq 0.05$). Los tratamientos que incluyeron productos biológicos, mejoraron el porcentaje de plantas emergidas respecto al tratamiento fungicida, sin diferencias significativas entre los productos biológicos ensayados. El incremento de la emergencia en los tratamientos con biológicos pudo deberse al control de hongos fitopatógenos asociados a las

infection percentages in greenhouse and field trials. The authors highlight the importance of applying *Bacillus* to be able to reduce the presence of this fungus that can produce aflatoxins, which contributes to safe peanut production.

In field trials, the emergence of plants at 28 DAS (Table 3) in all the applied treatments was higher than that of the control ($p \leq 0.05$). The treatments that included biological treatments improved the percentage of emerged plants compared to that of the fungicide treatment, with no significant differences between the biological products used. The increase in emergence in the biological treatments could be due to the control of phytopathogenic fungi associated with peanut seed. In this regard, Marani-Barbosa *et al.* (2013) informed that by efficiently controlling *A. flavus* transported on the seed, they improved peanut seedling emergence in the field. Results in which a better effect was obtained by applying a combination of a biological and a fungicide, compared to the effect obtained when applied alone, have been already described for *Bacillus* (Illa *et al.*, 2013; 2016) and *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008). The plant growth measured at 30 DAS (Table 3) indicated that all the treatments with biological products were better than the control ($p \leq 0.05$). In addition, no significant differences were detected between the treatment with fungicide and the evaluated biocontrols. At 165 DAS, the positive effect of the applied biologicals, alone and combined, was observed and was statistically different from the fungicide treatment. So, the application of biologicals improved plant growth by 11.8% compared to the fungicide treatment, and by 27.4% compared to the control. The average value of mature husks was 29%, with no significant differences between the evaluated treatments (Table 3). Based on the obtained results, we can conclude that the maturity index behaved independently from the sanitary status of the husks and the application of the biocontrols.

Cuadro 3. Emergencia, crecimiento de plantas y estado de madurez en maní como respuesta a diferentes tratamientos combinados de *Trichoderma*, *Bacillus* y Fungicida aplicados en semillas.**Table 3. Emergence, growth and maturity of peanut plants in response to different combined treatments of *Trichoderma*, *Bacillus* and fungicide applied to seed.**

Tratamiento	Emergencia (%)	Crecimiento de plantas		Madurez (%)
		30 DDS mg PS/planta	165 DDS g PS/planta	
Testigo	50 c	116 b	472 c	30 a
Fungicida	70 b	130 a	573 b	27 a
Fungicida + <i>Bacillus</i>	90 a	155 a	630 a	31 a
Fungicida + <i>Trichoderma</i>	80 a	147 a	641 a	29 a
Fungicida + <i>Bac.</i> + <i>Trich.</i>	90 a	160 a	680 a	27 a

Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican diferencias no significativas LSD $p \leq 0.05$ / Each value represents the average of four replications. Equal letters indicate no significant differences LSD $p \leq 0.05$.

semillas de maní. Al respecto, Marani-Barbosa *et al.* (2013) informaron que el control eficiente de *A. flavus* transportado por la semilla, mejoró la emergencia de las plántulas de maní en el campo. Resultados detectados con mejor efecto al aplicar de manera combinada un biológico más fungicida que de forma individual ya fue relatada tanto para *Bacillus* (Illa *et al.*, 2013; 2016) como para *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008). El crecimiento de plantas medido a los 30 DDS (Cuadro 3), mostró que todos los tratamientos con productos biológicos superaron al Testigo ($p \leq 0.05$). Además, no se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento con el fungicida y los de los biocontroladores evaluados. Mientras que a los 165 DDS, se observó el efecto positivo de los biológicos aplicados solos y combinados, presentando diferencia estadística al tratamiento fungicida. Así la aplicación de biológicos mejoró el crecimiento en 11.8% respecto al tratamiento fungicida y 27.4% en relación al Testigo. El valor promedio de vainas maduras fue del 29%, sin diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 3). De lo expuesto se deduce

Based on the results shown in Table 4, the husk and grain yields were higher in all the treatments compared to that of the control. In addition, the application of biologicals, alone and combined, increased grain yields by 45.2% compared to those of the control, and by 9.4% compared to the fungicide treatment. These results coincide with the results obtained by Shifa *et al.* (2016), who reported that when applying *Bacillus* and fungicide (Tebuconazole) to peanut seeds, there was an increase of around 40% in husk yield. The percentage of grains of confectionary quality (Table 4) did not show significant differences among the treatments applied to the seeds, but it did with the control. The yield increase appears to be a consequence of the growth promoter effect of the applied biologicals (Rojo *et al.*, 2007). In this regard, previous studies have shown that there is a positive correlation between the growth achieved by a peanut plant and its yield (Prasad *et al.*, 2009). The percentage of *T. frezzii* incidence on the husks was not significantly different between the control and the fungicide treatment (Table 4). This

que el índice de madurez se comportó de manera independiente al estado sanitario de las vainas y la aplicación de los biocontroladores.

En base a los resultados presentados en el Cuadro 4, el rendimiento de vainas y granos fue mayor en todos los tratamientos respecto al Testigo. Además, la aplicación de los biológicos solos y combinados logró aumentar los rendimientos en grano en un 45.2% respecto al Testigo y 9.4% al compararlo con el tratamiento fungicida. Estos resultados concuerdan con Shifa *et al.* (2016), quienes reportaron que al aplicar *Bacillus* más fungicida (Tebuconazole) en semillas de maní ocasionó un incremento de alrededor del 40% en el rendimiento de vainas. El porcentaje de granos de calidad confitería (Cuadro 4) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a las semillas, pero sí con respecto al Testigo. El incremento en los rendimientos aparece como consecuencia del efecto promotor del crecimiento por los biológicos aplicados (Rojo *et al.*, 2007). En relación a ello, estudios llevados a cabo han demostrado que existe una correlación positiva entre el crecimiento alcanzado por la planta de maní y el rendimiento (Prasad *et al.*, 2009). El porcentaje de incidencia de *T. frezzi* en vainas no fue significativamente diferente entre el Testigo y el tratamiento Fungicida (Cuadro 4). Esto demostró

fact demonstrated that the synthetic product did not control the disease, in contrast with what Astiz and Wojsko (2011) observed *in vitro*, and Buffoni and Marraro (2010) in Colorado peanut in field trials. It must be highlighted that controlling this disease is relevant because of the important losses it causes and its potential spread to new crop areas (Ganuza *et al.*, 2017). The treatments with *B. subtilis* and *T. harzianum* that were applied, alone and combined, did not show significant differences ($p \leq 0.05$) between them, but they did when compared to the control and the fungicide treatment. The results obtained when biocontrols were applied show a decrease in *T. frezzi* incidence. This coincides with the results obtained by Ganuza *et al.* (2017), who evaluated peanut seeds inoculated with *T. harzianum* ITEM 3636, and controlled *T. frezzi* by 17% and 25%, depending on the evaluated year.

It is important to highlight that pre-treating seed with biologicals is an alternative for controlling this severe disease that reduces yields more than 30%, making peanut production economically non-viable (Paredes *et al.*, 2017). The results of this study show that there are benefits when applying *B. subtilis* and *T. harzianum* to peanut, from the phytosanitary perspective and for increasing yield. It should also be noted that numerous studies have

Cuadro 4. Rendimiento de vainas y granos e incidencia de *T. frezzi* en maní, con diferentes tratamientos combinados de *Trichoderma*, *Bacillus* y Fungicida aplicados en semillas.

Table 4. Husk and grain yield and incidence of *T. frezzi* in peanut, with different combined treatments of *Trichoderma*, *Bacillus* and fungicide applied to seeds.

Tratamiento	Rendimiento vainas qq/ha	Rendimiento granos qq/ha	Granos confitería %	Incidencia <i>T. frezzi</i> %
Testigo	37.8 c	25.7 c	39.5 b	28.3a
Fungicida	62.5 b	42.5 b	59.4 a	30 a
Fungicida + <i>Bacillus</i>	65.1 a	47.3 a	61.2 a	15.3 b
Fungicida + <i>Trichoderma</i>	64.9 a	45.5 a	60.9 a	17.5 b
Fungicida + <i>Bac.</i> + <i>Trich</i>	68.3 a	47.9 a	59.8 a	12.7 b

Cada valor representa el promedio de cuatro repeticiones. Letras iguales indican diferencias no significativas LSD $p \leq 0.05$ / Each value represents the average of four replications. Equal letters indicate no significant differences LSD $p \leq 0.05$.

que el producto sintético no controló la enfermedad en contraposición a lo propuesto por Astiz y Wójcicko (2011) *in vitro* y Buffoni y Marraro (2010) en maní Colorado en ensayos de campo. Es de destacar que el control de esta enfermedad se vuelve relevante debido a las importantes pérdidas ocasionadas y su posible expansión hacia nuevas áreas de cultivo (Ganuza *et al.*, 2017). Por su parte, los tratamientos con *B. subtilis* y *T. harzianum* aplicados de forma individual y combinados, no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre ellos pero sí al compararlos con el Testigo y el tratamiento con Fungicida. Los resultados obtenidos al aplicar biocontroladores muestran una disminución en la incidencia de *T. frezzi*. Esto concuerda con lo informado por Ganuza *et al.* (2017) al evaluar semillas de maní inoculadas con *T. harzianum* ITEM 3636, quienes observaron un control de 17% y 25% de *T. frezzi*, dependiendo del año evaluado.

Es importante destacar que el pretratamiento de semillas con biológicos, se constituiría en una alternativa a considerar para el control de esta severa enfermedad que disminuye en más del 30% el rendimiento, haciendo inviable económicamente la producción (Paredes *et al.*, 2017). Los resultados de este estudio demuestran que hay beneficios al aplicar *B. subtilis* y *T. harzianum* en maní, desde el punto de vista sanitario como en el incremento del rendimiento. Además, se debe tener en cuenta que numerosos estudios han demostrado la inocuidad de estos microorganismos y que no existen restricciones en los códigos alimentarios al registrar su presencia en granos. La inoculación con *T. harzianum* y *B. subtilis* en condiciones controladas mostró la actividad antifúngica sobre los patógenos *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* y *T. frezzi* en plantas de maní a los 60 DDS. El mejor control se logró con la aplicación combinada de los biológicos evaluados. En los ensayos de campo, la aplicación de los productos biológicos solos y combinados,

shown that these microorganisms are safe and that there are no restrictions in the food codes when their presence is detected on grains. Inoculation with *T. harzianum* and *B. subtilis* under controlled conditions showed antifungal activity on the pathogens *A. flavus*, *Fusarium* sp., *S. minor* and *T. frezzi* in peanut plants at 60 DAS. The best control was achieved when the evaluated biologicals were combined. In field trials, the application of biological products, alone and combined, improved emergence at 28 DAS and plant growth at 165 DAS. This resulted in higher husk and grain yield, increase in the proportion of bigger grains, without affecting the maturity level. At the end of the cycle, the application of the evaluated biologicals reduced *T. frezzi* incidence by 14% compared with the control and the fungicide. The biocontrolling and stimulating effect of *T. harzianum* and *B. subtilis* on peanut growth suggests that their application will benefit the crop and can be considered a technological strategy to be added during sowing.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

mejoró la emergencia a los 28 DDS y el crecimiento de las plantas a los 165 DDS. Esto resultó en mayor rendimiento de vainas y granos, aumento de la proporción de granos con mayor tamaño sin afectar el grado de madurez. Al final del ciclo, las aplicaciones de biológicos evaluadas disminuyeron un 14% la incidencia de *T. frezzi*, respecto al Testigo y al fungicida. El efecto biocontrolador y estimulante de *T. harzianum* y *B. subtilis* en el crecimiento del maní, sugiere que su aplicación resultaría beneficiosa al cultivo y puede considerarse como estrategia tecnológica para adicionar al momento de la siembra.

## LITERATURA CITADA

- Andrés JA, Pastor NA, Ganuza M, Rovera M, Reynoso MM and Torres A. 2016. Biopesticides: An Eco-Friendly Approach for the Control of Soil borne Pathogens in Peanut. In: Singh *et al.* (Eds.) Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity. Springer, India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_9)
- Ankati S, Swaroopa Rani T and Podile A. 2018. Partner-triggered proteome changes in the cell wall of *Bacillus sonorensis* and roots of groundnut benefit each other. Microbiological Research. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.003>
- Astiz GMM y Wojszko A. 2011. Evaluación *in vitro* de fungicidas curasemillas para el control químico del carbón de maní (*Thecaphora frezii*). XXV Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba, Argentina. <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2026/Microsoft%20Word%20-%2021Astiz%20-%20Wojsko%20-%20Nova%20-%20Poster.pdf> (consulta, mayo 2019).
- Bashan Y, De-Bashan LE, Prabhu SR and Hernandez JP. 2013. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). Plant Soil 378:1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Buffoni A y Marraro F. 2010. Evaluación de fungicidas curasemillas y su efecto en el carbón del maní causado por *Thecaphora frezii*. XXVI Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba, Argentina. <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2025/4-MARR~1.PDF> (consulta, mayo 2019).
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M y Robledo CW. 2018. InfoStat versión 2018. [Software de cómputo]. Córdoba, Argentina, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>
- Ganuza M, Pastor N, Erazo J, Andrés J, Reynoso MM, Rovera M and Torres AM. 2017. Efficacy of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanuts mut, an emergent disease caused by *Thecaphora frezii*. Eur J Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1360-0>
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2, 43. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4–10. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Illa C, Cuggino S, Kopp S, Sebastián y Pérez M, Ullarte A y Pérez MA. 2013. Efecto de la aplicación combinada de *B. subtilis* más fungicidas sobre la calidad fitosanitaria de semillas de maní y el crecimiento posterior de las plantas. XXVIII Jornada Nacional de Maní, General Cabrera, Córdoba, Argentina. Recuperado de: <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2028/4-%20ILLA.pdf> (consulta, junio 2019)
- Illa C, Kopp S, Olivo A y Pérez MA. 2016. Efecto de tratamientos profesionales de fungicidas, polímeros, inoculantes y *Bacillus subtilis* aplicados en semillas de maní sobre el comportamiento a campo desde emergencia hasta cosecha. Jornada Nacional de Maní. Recuperado de: <http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA>.
- INTA. 2018. La enfermedad del carbón amenaza al maní cordobés <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=42494> (consulta, mayo 2019)
- Marani-Barbosa R, Faria dos Santos J, Mendonça Lopes M, Cássia Panizzi R and Daiton Vieira R. 2013. Chemical control of pathogens and the physiological performance of peanut seeds. Journal of Food, Agriculture & Environment 11(2): 322–326. [https://www.researchgate.net/publication/242149973\\_Chemical\\_control\\_of\\_pathogens\\_and\\_the\\_physiological\\_performance\\_of\\_peanut\\_seeds](https://www.researchgate.net/publication/242149973_Chemical_control_of_pathogens_and_the_physiological_performance_of_peanut_seeds) (consulta, mayo 2019)
- March GJ y Marinelli AD. 2005. Enfermedades del Maní en Argentina. 1 ed. Fundación Maní Argentino. 142 pp.
- Paredes JA, Cazón LI, Osella A, Peralta V, Alcalde M, Kearney MI, Zuza MS, Rago AM y Oddino C. 2017. Relevamiento regional del carbón del maní y estimaciones de pérdidas producidas por la enfermedad. XXXII Jornada Nacional de Maní. Gral Cabrera [ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2026/Microsoft%20Word%20-%2021Astiz%20-%20Wojsko%20-%20Nova%20-%20Poster.pdf](http://www.ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2026/Microsoft%20Word%20-%2021Astiz%20-%20Wojsko%20-%20Nova%20-%20Poster.pdf) (consulta, mayo 2019)
- Pérez MA, Cavallo AR y Pedelini R. 2004. Indicadores de madurez en frutos de maní (*Arachis hypogaea* L.) cv. Florman, para la producción de semillas en la provincia de Córdoba. Agriscientia 21 (2):77–83. <file:///C:/Users/mani/Downloads/2670-Texto%20del%20art%C3%ADculo-8820-1-10-20120823.pdf> (consulta, junio 2019)
- Pérez, A and Arguello JA. 1995. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds under natural and accelerated aging. Seed Science & Technology 23: 439–445.
- Prasad, PVV, Kakani, VG and Upadhyaya HD. 2009. Growth and production of groundnuts. In W. H. Verheye (Ed.), Soils, Plant Growth and Crop Production pp. 138–167. Oxford: Encyclopedia of Life Support Systems. Eolss Publishers.
- Pretali L, Bernardo L, Butterfield TS, Trevisan M. and Lucini L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. Phytochemistry 130: 56–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.002>
- Rojo FG, Reynoso MM, Ferez M, Chulze SN and Torres AM. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solanica* using peanut brown root rot under field conditions. Crop Protection 26: 549–555. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.006>
- Rosso M, Bressano M, De Blas F, Buteler M, Soave J, Soave S, Giordano F, Giuggia J, Lupano G, Moresi A, Seijo G y Oddino C. 2018. Comportamiento de una población de líneas recombinantes endocriadas (RILS) frente a tizón del maní causado por *Sclerotinia minor*. XXXIII Jornada del Maní. [http://ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2033/18.-%20COMPORTAMIENTO%20DE%20UNA%20POBLACI%C3%93N%20DE%20LINEAS%20RECOMBINANTES%20ENDOCRIADAS%20\(RILS\)%20FRENTE%20A%20TIZ%C3%93N%20DEL%20MANI%20CAUSADO%20POR%20Sclerotinia%20minor.pdf](http://ciacabrera.com.ar/docs/JORNADA%2033/18.-%20COMPORTAMIENTO%20DE%20UNA%20POBLACI%C3%93N%20DE%20LINEAS%20RECOMBINANTES%20ENDOCRIADAS%20(RILS)%20FRENTE%20A%20TIZ%C3%93N%20DEL%20MANI%20CAUSADO%20POR%20Sclerotinia%20minor.pdf) (consulta, junio 2019)

- Sharma PK and Gothwal R. 2017. Trichoderma: A potent fungus as biological control agent. Pp:113-125. In: Singh J., Seneviratne G. (eds) Agro-Environmental Sustainability. Springer, Cham. [https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2\\_6](https://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49724-2_6)
- Sherathia D, Dey R, Thomas M, Dalsania T, Savsani K and Pal KK. 2016. Biochemical and molecular characterization of DAPG-producing plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Legume Research 39 (4): 614-622. <https://doi.org/10.18805/Lr.v0iOF.9389>
- Shifa H, Tasneem S, Gopalakrishnan C and Velazhahan R. 2016. Biological control of pre-harvest aflatoxin contamination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Bacillus subtilis* G1, Archives of Phytopathology and Plant Protection. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1160642>
- Singh UB, Malvivya D, Singh S, Imran M, Pathak N, Alam M, Rai JP, Singh RK, Sarma BK, Sharma PK and Sharma AK. 2016. Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). Applied Soil Ecology 108: 300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>
- Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM y Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos patógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas 42: 131-138. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf> (consulta, mayo 2019)
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA and Estrada-Alvarado MI. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbeti MJ, Li H, Woo SL and Lorito M. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiol Mol Plant Pathology 7: 80-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Woo SL, Scala F, Ruocco M and Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. Phytopathology 96: 181-185. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>