

METODO DE LABORATORIO PARA EVALUAR LA EFECTIVIDAD DE FUNGICIDAS CONTRA HONGOS PATOGENOS FORESTALES (1)

O. Alonso

Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile
Casilla 567, Valdivia, Chile.

H. Peredo, R. Barría, S. Chacón

Instituto de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad Austral de Chile
Casilla 567, Valdivia, Chile.

RESUMEN

Basándose en métodos tradicionales de laboratorio, se propone una técnica simplificada para evaluar "in vitro" el comportamiento de diferentes fungicidas frente a hongos patógenos forestales. En agar fungicida de diferentes concentraciones se determinó la Dosis Mínima Inhibitoria (DMI) en base al recuento de colonias de los hongos de prueba *Dothistroma septospora* y *Botrytis cinerea*. La Dosis Mínima Letal (DML), se determinó por el desarrollo de colonias en agar-malta, a partir de esporas y micelio de los hongos de prueba incubados por 10 días en caldo fungicida de diferentes concentraciones.

Para *D. septospora*, la DMI y DML correspondió a 2,5% de concentración en todos los fungicidas probados. En la DMI determinada, Antracol Cobre (MR BAYER) resultó ser el fungicida más efectivo. El desarrollo invasor de la colonia de *B. cinerea* impidió hacer un análisis estadístico de los resultados, no obstante se pudo determinar que Euparen (MR BAYER) y Captan (MR BAYER) fueron los fungicidas más efectivos.

Se discuten algunas limitaciones del método para proponerlo como una técnica de rutina en ensayos "in vitro" de sensibilidad.

INTRODUCCION

Dothistroma septospora (Dorog.) Morelet, es el agente causal del "tizón de la aguja", la enfermedad forestal más común en plantaciones jóvenes de *Pinus radiata* D. Don en Chile (DUBIN, 1965; RAMIREZ et al., 1982). Otro organismo de reconocida agresividad es *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.,

SUMMARY

[Laboratory method to test the effectiveness of fungicides against forest pathogenic fungi]

Based on traditional laboratory methods, a simplified technique for the evaluation "in vitro" of the behaviour of fungicides against forest pathogenic fungi is proposed. In agar-fungicide of different concentrations the minimal inhibitory dose (MID) was determined according the growth of colonies of the test fungi *Dothistroma septospora* and *Botrytis cinerea*. The minimal lethal dose (MLD) was determined through the development of colonies in malt agar, from spores and mycelium of the test fungi grown during ten days in fungicide-broth at different concentrations.

For *D. septospora* the MID and MLD was 2.5% for all the tested fungicides. In the determined MID Antracol Cobre (TM BAYER) was the most effective fungicide. Although the invading development of the colonies from *B. cinerea* hindered an statistical analysis of the results, Euparen (TM BAYER) and Captan (TM BAYER) were determined as the most effective fungicides.

Some limitations to propose the methods as a routine technique in "in vitro" of sensibility are discussed.

el que ocasiona la enfermedad conocida como "moho gris" en viveros forestales. Aislado por primera vez a partir de plantas de *P. radiata* (VERGARA, 1951), se encuentra ahora diseminado en casi todos los viveros forestales del Sur de Chile (RODRIGUEZ et al., 1980).

La intensidad de los daños ocasionados por *D. septospora* y *B. cinerea*, hacen necesario su control, siendo el químico una de las modalidades más recurridas.

La contaminación y alteración del ecosistema natural, la toxicidad para hombres y animales y los costos de la aplicación en gran escala de los productos

(1) Basado en las Tesis de Grado de Ruth Barría y Sylvia Chacón, financiadas por el Convenio CONAF-UACH "Prospección Nacional Sanitaria Forestal".

comúnmente usados en el control químico de las dos enfermedades mencionadas, hacen necesario un estudio previo de laboratorio para preseleccionar un fungicida efectivo y que no presente las desventajas citadas. Para lograr este propósito se han propuesto diversos ensayos de laboratorio. GATTANI (1954) determinó la resistencia o sensibilidad de esporas frente a diferentes fungicidas, observando su capacidad germinativa en placas Petri con agar fungicida. Con ello simplificó el método de la "gota de agua" propuesto por el Committee on the Standardization of Fungicidal Test de la American Phytopathological Society.

El objetivo de este trabajo fue probar una técnica de fácil manejo y aplicación, que permita evaluar "in vitro" la efectividad de diferentes fungicidas. Para ello se seleccionaron las especies destacadas anteriormente, pues se cultivan fácilmente en medios sintéticos (GAERTEN, 1967; RACK y BUTTIN, 1973). Frente a ellas se determinaron la Dosis Mínima Inhibitoria (DMI) y Dosis Mínima Letal (DML) de los fungicidas seleccionados.

MATERIAL Y METODO

Las cepas de *D. septospora* y *B. cinerea*, se obtuvieron del cepario del Instituto de Silvicultura de la Universidad Austral de Chile.

Con *D. septospora* se probaron los fungicidas OXICUP: Oxiclouuro de Cu 90% (MR MUSSLA); CALDO BORDELES: Sulfato de Cu 2% e Hidróxido de Calcio 2,7% , ANTRACOL COBRE: Propineb 24,5% y Oxiclouuro de Cu 37,5% (MR BAYER); y CUPRAVIT FORTE: Cu metálico 50% (MR BAYER).

Para *B. cinerea* los productos probados fueron EUPAREN: Dichlofluanid 50% (MR BAYER); OXICUP; BAYLETON: Triadimefon 25% (MR BAYER); CAPTAN: Captan 80% (MR BAYER) y POLIRAM: Metiram 80% (MR BASF).

A fin de determinar las Dosis Mínima Inhibitoria (DMI) de cada producto a ensayar para *D. septospora* se prepararon soluciones o suspensiones madres al 10%. A partir de éstas se hicieron diluciones en agar malta al 2%. Se obtuvieron así los medios agar-fungicida en las concentraciones 0,1 - 1,0 - 1,25 y 5,0%. Se prepararon cuatro placas por cada dilución con fungicida. Cada una fue inoculada

con 0,2 ml de una suspensión cuantificada de conidios, según el método descrito por RACK Y BUTTIN (1973). Como testigos se inocularon placas con agar malta al 2%. Después de 12-20 días de incubación a temperatura ambiente (20° C), se contó el número de colonias. En relación a la cantidad total de colonias que crecieron en las placas testigo, se calculó el porcentaje de inhibición de germinación de conidios.

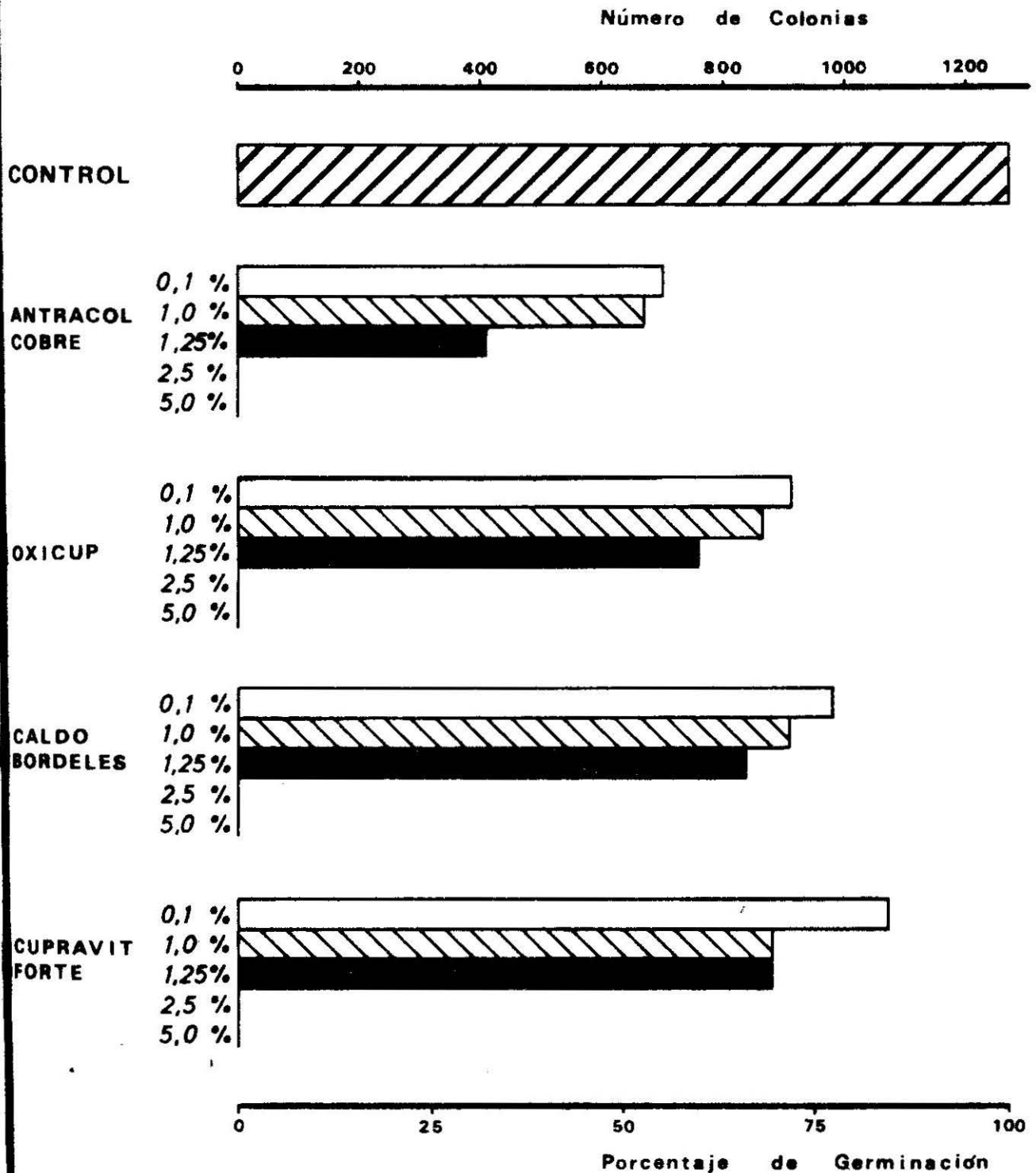
Para el caso de *B. cinerea* las concentraciones de fungicida utilizadas fueron 1,0 - 1,25 - 2,5 y 5,0%. Como inóculo se usó 0,2 ml. de una suspensión de conidios y micelio obtenida al lavar con agua estéril un cultivo desarrollado en agar malta por 10 días a 22° C. Se sembraron cuatro placas por cada concentración de fungicida y cuatro de agar malta como control, que fueron incubadas durante 10 días a 22° C. Por la característica invasora de las colonias de *B. cinerea*, los resultados fueron interpretados como positivos (+) o negativos (-), de acuerdo al desarrollo o no de micelio.

La Dosis Mínima Letal (DML) para ambos organismos, se determinó en 10 ml de caldo extracto-malta que contenía las mismas concentraciones usadas para el agar-fungicida. Se sembraron 4 tubos por cada concentración de fungicida utilizando el mismo inóculo del estudio de la DMI. Como testigos se usaron cuatro tubos de caldo extracto-malta, inoculados con el mismo procedimiento ya descrito. Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente, en agitación, durante diez días. Al cabo de este período, a partir de estos cultivos, se sembraron placas de agar-malta al 2%, que fueron incubados hasta 10 días a 22° C, haciéndose observaciones de ellas cada 48 horas. Como DML se interpretó aquella concentración del producto ensayado que impidió, el desarrollo del hongo en las placas con agar malta. la presencia de desarrollo se interpretó como positiva (+) y la ausencia como negativa (-).

RESULTADOS

Para *D. septospora* la DMI correspondió a la concentración 2,5% en todos los productos probados (Figura 1), pues en ella no se observó desarrollo de colonias. La DML se ubicó en la misma concentración de la DMI en todos los productos probados (Cuadro 1).

FIGURA Nº 1



Dosis Mínima Inhibitoria para conidios de *Dothistroma septospora* en agar-fungicida. En las concentraciones 2,5 y 5,0%, ningún fungicida permitió desarrollo de colonias.

El producto más efectivo de la DMI determinada fue Antracol Cobre que demostró diferencias significativas al 1% respecto al testigo y al 5% considerando los otros productos. Oxicip, Caldo Bordeles y Cupravit Forte mostraron a su vez diferencias significativas al 5% respecto al testigo, pero no entre ellos.

CUADRO 1

Siembras de *D. septospora* realizadas en Agar-malta a partir de las distintas concentraciones de Caldo-fungicida.

Caldo Fungicida de origen	Concentración (%)	Desarrollo
Antracol Cobre	0,1	+
	1,0	+
	1,25	+
	2,5	-
	5,0	-
Oxicup	0,1	+
	1,0	+
	1,25	+
	2,5	-
	5,0	-
Caldo Bordeles	0,1	+
	1,0	+
	1,25	+
	2,5	-
	5,0	-
Cupravit Forte	0,1	+
	1,0	+
	1,25	+
	2,5	-
	5,0	-
CONTROL		+

En el caso de *B. cinerea* el desarrollo invasor de su micelio impidió el recuento de colonias aisladas. Los resultados de las DMI se observan en el Cuadro 2, y respecto a las DML, puede destacarse que sólo hubo crecimiento de micelio en todas las concentraciones de Bayleton después del octavo día y en los testigos después del cuarto día.

CUADRO 2

Desarrollo de micelio de *B. cinerea* en agar-fungicida.

Agar Fungicida	Concentración (%)	Desarrollo			
		1 Día	6 Días	8 Días	10 Días
Oxicup	1,0	+	+	+	+
	1,25	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+
	5,0	+	+	+	+
Bayleton	1,0	-	+	+	+
	1,25	-	+	+	+
	2,5	-	+	+	+
	5,0	-	+	+	+
Polyram	1,0	-	-	+	+
	1,25	-	-	+	+
	2,5	-	-	-	+
	5,0	-	-	-	+
Captan	1,0	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-
	2,5	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-
Euparen	1,0	-	-	-	-
	1,25	-	-	-	-
	2,5	-	-	-	-
CONTROL		+	+	+	+

Los fungicidas Euparen y Captan demostraron ser los más efectivos, pues no permitieron el desarrollo de *B. cinerea* en ninguna de las concentraciones probadas tanto en Agar-fungicida como en Caldo-fungicida. Polyram retardó el desarrollo de micelio, hasta el octavo día en las concentraciones 2,5 y 5% en Agar-fungicida y no produjo efecto en ninguna concentración de Caldo-fungicida. Bayleton por su parte retardó el desarrollo de micelio hasta el sexto día, en todas las concentraciones probadas en Agar-fungicida y hasta el octavo día en Caldo-fungicida. Oxicup permitió el desarrollo de micelio en todas las concentraciones probadas en Agar-fungicida, pero lo impidió en todas las concentraciones probadas en Caldo-fungicida.

DISCUSION

Al comparar la facilidad de manipulación, tanto de los organismos como de los fungicidas, se apreció una ventaja evidente del método descrito, respecto a los métodos hasta ahora conocidos (GATTANI, 1954, GAERTEL, 1967). En ensayos posteriores de laboratorio se ha usado con éxito (SANTAMARIA, 1982), pues el método es de fácil aplicación para probar la sensibilidad o resistencia de hongos frente a diferentes fungicidas. *D. septospora* produce colonias aisladas, permitiendo mediante el recuento de ellas, analizar la variación estadística existente entre los tratamientos y las repeticiones. La característica invasora de las colonias de *B. cinerea* impidió el recuento de ellas y no fue posible apreciar variaciones estadísticas entre los tratamientos y repeticiones. Para los hongos con este tipo de crecimiento, sería preferible medir el incremento diametral de las colonias (GAERTEL, 1967).

La coincidencia de la DMI y DML para *D. septospora*, indica la necesidad de probar concentraciones comprendidas entre 1,25 y 2,5% con el fin de determinar la DMI real. Debe considerarse si los datos aportados por KLIEJUNAS y KO (1975), quienes estudiando el desarrollo de diferentes hongos determinaron que en medios sólidos el crecimiento es ilimitado y en medios líquidos limitado. Por esto último, parecería conveniente hacer estudios de sensibilidad, sólo en medio sólido. Con respecto a esto, se conocen además los antecedentes de KO et al., (1976) que indican una disminución de la efectividad de los productos cúpricos cuando son estudiados en medios con agar. Bajo este mismo considerando, debe destacarse la mejor respuesta de Antracol Cobre frente al resto de los fungicidas. Este resultado podría deberse a la actividad de

Propineb presente en su formulación en un 24,5% y que no sería afectado por el efecto inhibitor del agar.

De los cinco fungicidas estudiados, sólo Euparen y Captan son recomendados para combatir *B. cinerea*, según lo señala la literatura especializada. Esto explicaría los resultados negativos de Bayleton y Oxocup. Polyrám podría considerarse sólo como un inhibidor debido a que permitió crecimiento después de 8 días en agar-fungicida.

Los resultados de Oxocup aparentemente contradictorios si se compara el crecimiento de micelio en agar-fungicida y en caldo-fungicida, pueden explicarse por el planteamiento de KLIEJUNAS y KO (1975), acerca del crecimiento limitado de los organismos en medio líquido y por la baja de la efectividad de los fungicidas cúpricos mezclados con agar determinada por KO et al., (1976).

El comportamiento de Bayleton, sería explicable por las mismas razones dadas para Oxocup. Esto y teniendo presente que aquel es un fungicida sistémico harían recomendable probar su eficacia mediante otros métodos. Debe destacarse además que produjo ramificaciones anormales de los conidióforos y ubicación subterminal de conidios, efecto que no fue observado en ningún otro tratamiento (CHACON, 1978). En estudios posteriores, se propone estudiar la virulencia de las cepas alteradas por el efecto de Bayleton.

Como prueba de eficiencia del método propuesto, los resultados se consideran en general satisfactorios. Su fácil aplicación y manejo permiten recomendarlo en los estudios "in vitro" de diversas especies fúngicas frente a diferentes fungicidas. Debe tenerse presente no obstante, que los resultados obtenidos al aplicar esta técnica deberían ser corroborados en ensayos piloto "in vivo".

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Sra. Sonia Momborg la colaboración prestada en el establecimiento y evaluación de algunos ensayos.

REFERENCIAS

- Barría, R. 1977. Evaluación "in vitro" del efecto de diferentes fungicidas sobre esporas de *Dothistroma pini* Hulb. Tesis Tecnol. Médico. Valdivia, Universidad Austral de Chile. 25 p.
- Chacón, S. 1978. Determinación "in vitro" de la sensibilidad de *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. frente a diversos fungicidas. Tesis Prof. Biología y Química. Valdivia. Universidad Austral de Chile. 23 p.
- Dubin, H. J. 1965. Una breve nota sobre *Dothistroma pini* Hulbary. Tizón de la aguja del *Pinus radiata* D. Don en Chile. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Publicaciones Científicas N° 9. 9 p.
- Gaertel, W. 1967. Schalen-Diffusionstest zur Prüfung der Wirksamkeit Fungiziden gegen *Botrytis cinerea*. Weinberg u. Keller 14 : 410-413.

- Gattani, M. L. 1954. The agar plate spore germination method for testing fungicides. *Phytopathology* 44 : 113-115.
- Kliejunas, J. T. & Ko, W.H. 1975. Continuous versus limited growth of fungi. *Mycología* 67 (2) : 362-366.
- Ko, W. H.; Kliejunas, J. T. & Shimooka, J. T. 1976. Effect of agar on inhibition of spore germination by chemical. *Phytopathology* 66 (3) : 363-366.
- Rack, K. & Butin, H. 1973. A quick method for the production of *Dothistroma pini* spores in culture. *Eur. J. For. Path.* 3 : 201-209.
- Ramírez, O.; Gajardo, J. y Solís, E. 1982. Informe final Prospección Fitosanitaria Forestal. Temporada 1981-1982. Santiago. Corporación Nacional Forestal, Gerencia Forestal. Documento de Trabajo N° 2. 111 p.
- Rodríguez, C.; Cerda, L. y Peredo, H. 1980. Detección de insectos causantes de daños en viveros de *Pinus radiata* de la Décima Región. *Bosque* 3 (2) : 73-76.
- Santamaría, A. 1982. Taxonomía, biología y control del agente causal del doblamiento apical en plátulas de Pino insigne (*Pinus radiata* D. Don). Tesis Ing. Forestal. Valdivia. Universidad Austral de Chile. 68 p.
- Vergara, C. 1981. Nuevas determinaciones micológicas para Chile. *Agric. Tec. Chile* 11 (1) : 86.