

Ensayo *in vitro* de eficacia de fungicidas frente a *Pythium tracheiphilum* en lechuga

Ana J. González (Laboratorio de Fitopatología, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Villaviciosa, Asturias e-mail: anagf@serida.org).

Fermín Menéndez (Sección de Sanidad Vegetal, Consejería de Medio Rural y Pesca, Oviedo).

Pythium tracheiphilum es el agente causal de una enfermedad vascular en lechuga (*Lactuca sativa* L.) diagnosticada en Asturias. Los tratamientos antifúngicos utilizados (propamocarb y fosetil-Al) no fueron eficaces en el control de la enfermedad. Para poder establecer una pauta terapéutica se realizó un ensayo de eficacia *in vitro* de cinco productos fitosanitarios comerciales, cuyas materias activas eran: metalaxil (8%) + mancozeb (64%), himexazol (36%), fosetil-Al (80%), dimetomorf (7,5%) + mancozeb (66,7%) y propamocarb (72,2%). Se evaluó únicamente el efecto de los productos respecto al desarrollo del micelio. La disminución del diámetro de la colonia respecto al control se utilizó como indicador de inhibición (total o parcial) del crecimiento. El producto más eficaz fue la mezcla de metalaxil + mancozeb que impidió el crecimiento fúngico a 64 µg/ml, tuvo efecto fungicida y fue útil también en campo.

Palabras clave: lechuga, *P. tracheiphilum*, fitosanitarios, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La lechuga es el principal cultivo hortícola de Asturias con 6.060 t producidas en 2001 (www.sadei.es). Desde 2002 se ha venido detectando en este cultivo un problema fitopatológico en una explotación del concejo de Villaviciosa (Asturias), tanto al aire libre como en invernadero, que ha podido ser asociado a la presencia de *Pythium tracheiphilum* (GONZÁLEZ *et al.*, 2004). Los síntomas de esta enfermedad corresponden a necrosis en la zona del cuello y tallo que se extiende a las hojas interiores (Figura 1). Cuando se realiza un corte longitudinal de la zona del cuello se observa un oscurecimiento de los vasos propio de las enfermedades vasculares. Las pérdidas producidas por esta patología se estimaron en un 20% de la producción en el cultivo al aire libre en verano.

Como tratamientos fitosanitarios durante el cultivo se habían utilizado, primero una solución de propamocarb al 0,1% mediante la inmersión de la base del taco con la plántula antes del transplante, y posteriormente, siguiendo el mismo método, fosetil-Al al 0,3%. Puesto que los tratamientos empleados no fueron eficaces en el control de la enfermedad, se procedió a realizar un ensayo *in vitro* de diferentes materias activas recomendadas para su uso frente a *Pythium* u otros oomicetos, con vistas a establecer la pauta terapéutica apropiada para este caso. Los métodos de evaluación *in vitro* de fungicidas (LEROUX *et al.*, 1977; MARTÍN *et al.*, 1984; GONZÁLEZ Y FUEYO, 1993; GONZÁLEZ, 2000; TAYLOR *et al.*, 2002) constituyen el primer paso para conocer la eficacia de un producto, son relativamente fáciles y rápidos de realizar y proporcionan un índice de su valor práctico.

Material y métodos

Los productos fitosanitarios comerciales ensayados fueron: himexazol (36%), fosetil-Al (80%), propamocarb (72,2%) y las mezclas de metalaxil (8%) + mancozeb (64%) y dimetomorf (7,5%) + mancozeb (66,7%).

Como medio de cultivo para la propagación del hongo se utilizó APD (agar de patata y dextrosa). El método de evaluación utilizado fue el de la medida del efecto sobre el desarrollo del micelio tal y como se describió previamente en González y Fueyo (1993) y González (2000). Los productos a en-

sayar se incorporaron al medio de cultivo en cantidad apropiada para conseguir las dosis de ensayo, que siguieron una progresión geométrica de 1 a 1024 µg/ml de cada producto, referidas siempre a la materia activa de referencia, es decir, metalaxil, himexazol, fosetil-Al, dimetomorf y propamocarb.

carb. Se incluyó un testigo sin productos. Las placas con 1024 $\mu\text{g/ml}$ de fosetil-Al no solidificaron, por lo que no se ensayó esta concentración. La adición del producto al medio se realizó una vez esterilizado éste y manteniéndolo a 50°C, tras lo cual se vertió en placas de cultivo de 9 cm de diámetro.

Como inóculo se utilizaron discos de igual tamaño de un cultivo en crecimiento activo de hongo en medio APD. Estos discos se colocaron de forma que el hongo quedó en contacto directo con el producto ensayado.

Las placas se incubaron dos días a 25°C y el crecimiento se estimó mediante la media de los diámetros perpendiculares de las colonias medidos con un pie de rey. La disminución del diámetro de las colonias respecto a las colonias control, medido antes de ocupar toda la superficie de la placa, se utilizó como indicador de inhibición, total o parcial, del crecimiento.

Para determinar el efecto fungistático o fungicida se procedió a resembrar el inóculo de las placas en las que se había producido la inhibición del crecimiento, en medio APD sin producto, considerándose la acción de éste fungicida si no había crecimiento en este medio y fungistática cuando lo había.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados

Los datos referidos a la reducción del crecimiento producida por los productos ensayados respecto al testigo se representan gráficamente en la Figura 2.

La mezcla de metalaxil y mancozeb resultó ser el tratamiento más eficaz pues a 1 $\mu\text{g/ml}$ el producto consiguió reducir el crecimiento del micelio en aproximadamente un 61%. La inhibición total del crecimiento o concentración inhibitoria mínima (C.I.M.), se situaría en el rango entre 32-64 $\mu\text{g/ml}$. Resembrando el inóculo correspondiente a las concentraciones de 64 $\mu\text{g/ml}$ y superiores se comprobó que este fitosanitario tenía acción fungicida.

El himexazol redujo a un 50% el crecimiento del micelio a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, el aumento de la dosis consiguió pequeñas diferencias graduales en el efecto, de forma que la inhibición total sólo se consigue a 1024 $\mu\text{g/ml}$. A esta concentración el producto se comportó como fungicida.

En el caso de la mezcla de dimetomorf y mancozeb, se inhibió el crecimiento fúngico a 256 $\mu\text{g/ml}$ y el producto se comportó como fungistático a esta concentración y como fungicida a las dos siguientes, es decir, a 512 y 1024 $\mu\text{g/ml}$.

El fosetil-aluminio ha tenido una escasa eficacia, observándose una reducción del crecimiento



Figura 1. Muestras de lechuga mostrando síntomas de infección por *P. tracheiphilum*.

en torno al 62% a 512 $\mu\text{g/ml}$.

Al igual que en el caso anterior, el propamocarb no consiguió inhibir totalmente el crecimiento del hongo ni siquiera a 1024 $\mu\text{g/ml}$. Hasta 128 $\mu\text{g/ml}$ apenas se observa su efecto, consiguiéndose una reducción de casi el 60% a 256 $\mu\text{g/ml}$.

Discusión

Es de resaltar que los dos productos fitosanitarios más eficaces fueron las mezclas de metalaxil y dimetomorf con mancozeb.

Tanto en el caso del metalaxil como del dimetomorf no fue posible ensayar por separado las materias activas, puesto que sólo se disponía de la mezcla con mancozeb. Señalar que el mancozeb se cita también para el control de *Pythium* spp. (De Liñán, 2000).

Para establecer qué papel cumple cada uno de los componentes de ambas mezclas en el control del hongo, sería necesario realizar el ensayo con los productos por separado y con la mezcla de forma que se conozca cuál es la eficacia de cada uno y la posible sinergia entre ellos.

El formulado de metalaxil con mancozeb se ha recomendado en lechuga para el control de varios patógenos incluyendo oomicetos y combina un fungicida sistémico, el metalaxil, con otro de contacto, el mancozeb, lo que ha sido propuesto para evitar la aparición de resistencias. En nuestro estudio, esta combinación ha resultado ser la más eficaz para el control *in vitro* de *P. tracheiphilum*.

El himexazol tiene una importante actuación sobre el crecimiento del micelio del hongo, de forma que reduce aproximadamente un 50% del crecimiento a 1 µg/ml. Sin embargo, para que un producto pueda utilizarse de manera eficaz se precisa que tenga como meta la inhibición total del crecimiento, puesto que una pequeña cantidad de micelio viable reproduce en poco tiempo la cantidad de inóculo inicial. En este sentido, el himexazol no dio buenos resultados ya que aumentos de dosis de producto sólo consiguen un progresivo aunque ligero aumento de la eficacia y la C.I.M. se sitúa entre 512 y 1024 µg/ml.

En el caso del fosetil-Al, se produjo un problema en la dosis de 1024 µg/ml, probablemente debido a una acidificación del medio que impidió la solidificación del agar. No se volvió a repetir el ensayo de esta dosis, corrigiendo este problema, puesto que a concentraciones inferiores ya se había visto que el producto no es muy eficaz. Con este producto se produjo una reducción del crecimiento miceliar en torno al 64% a 512 µg/ml. Quizás debido a la forma de actuación de este producto —se dice que mejora la defensa de la planta— la realización de ensayos *in vitro* no sea el mejor método para evaluar su eficacia; a pesar de ello se incluyó en el estudio porque había sido uno de los productos utilizados en campo.

En cuanto al propamocarb, la ineficacia de este producto en el control de *Pythium tracheiphilum* había sido ya mencionada por Messiaen *et al.* (1995). Sin embargo, otras informaciones siguen apuntando al uso de este producto en el control de la enfermedad (<http://www.masitaly.com/IT>) o, en general, para el control de oomicosis (De Liñán, 2000). En nuestro caso, el propamocarb no ha sido capaz de inhibir totalmente el crecimiento del micelio ni siquiera a 1024 µg/ml. Los datos obtenidos *in vitro* en este ensayo corroboran las observaciones de campo puesto que se había realizado tratamientos con propamocarb y fosetil-Al sin obtener resultados positivos.

En nuestro estudio, la combinación de metalaxil y mancozeb presentó un comportamiento claramente más eficaz en el control *in vitro* del hongo que los otros productos ensayados y, por tanto,

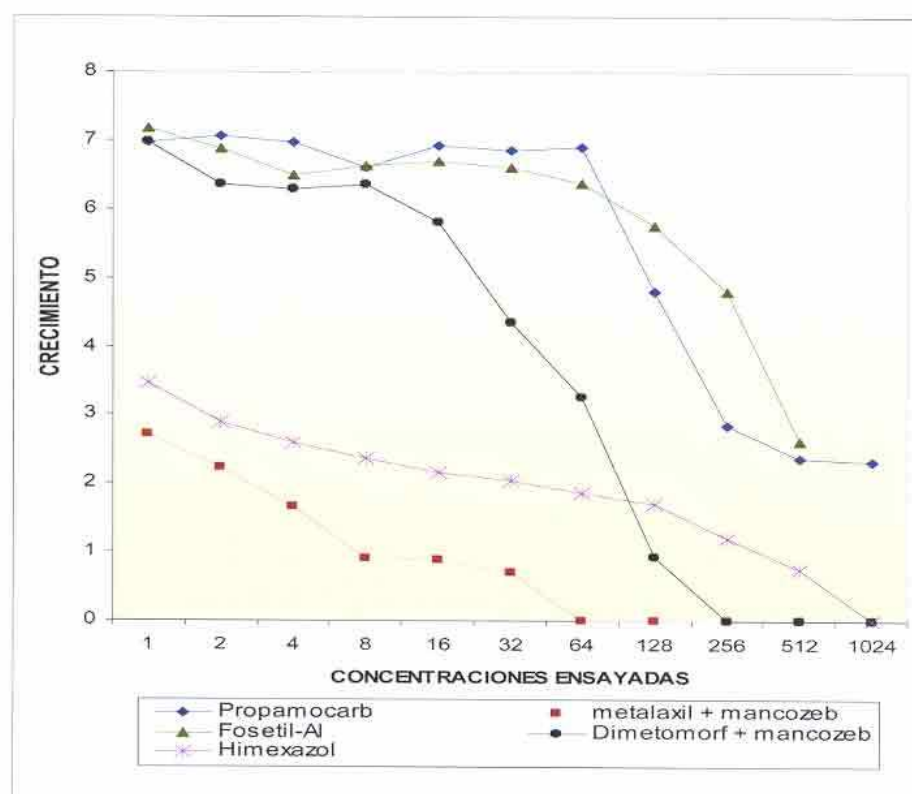


Figura 2. Representación gráfica del crecimiento (en cm.) de *Pythium tracheiphilum* en el ensayo *in vitro* de cinco productos fitosanitarios.

es la opción a recomendar. Teniendo en cuenta que la eficacia *in vitro* no necesariamente supone un buen control *in vivo*, donde hay que considerar otros factores, tales como la degradabilidad del compuesto, persistencia, mecanismo de actuación e interacción con otros compuestos. En nuestro caso, la opción terapéutica más eficaz *in vitro* se ha aplicado al campo, obteniendo el agricultor buenos resultados con la mezcla de metalaxil y mancozeb en el control de la enfermedad.

Conclusiones

En este estudio el producto más eficaz *in vitro* para el control de *Pythium tracheiphilum* ha sido la mezcla de metalaxil y mancozeb y, por tanto, lo hemos recomendado como opción terapéutica a utilizar en campo.

La mezcla de dimetomorf y mancozeb, no recomendado específicamente para el tratamiento de *Pythium*, también se ha mostrado eficaz frente a este hongo.

El himexazol ha mostrado actividad frente a *Pythium tracheiphilum*, pero el crecimiento total sólo lo ha eliminado a las concentraciones más elevadas ensayadas situándose la CIM entre 512 y 1024 µg/ml. Esto representa un serio inconveniente a su uso, ya que la reducción de crecimiento del hongo sólo supone un retraso en el desarrollo de la enfermedad, pues los microorganismos tienen un tiempo de generación corto, de forma que rápidamente se recuperan los niveles iniciales de inóculo.

El propamocarb y el fosetil-Al han sido ineficaces en nuestro estudio.

Por último destacar que la metodología empleada se ha mostrado útil para seleccionar una opción terapéutica química en casos en los que la pauta habitual no se muestra eficaz, ayudando a utilizar de una forma más racional los productos fitosanitarios, cuestión ésta de suma importancia si el objetivo es la realización de un cultivo "sostenible".

Agradecimientos. A Matilde Ávila por su cuidadoso trabajo de elaboración de los medios de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- DE LINÁN C. (2000). *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Ed Agrotécnicas S.L.
- GONZÁLEZ A. J., FUEYO M.A. (1993). *Ensayo in vitro del permanganato potásico frente a hongos patógenos aislados de judía granja asturiana (Phaseolus vulgaris L.)*. Bol. San. Veg. Plagas. **19**: 681-686.
- GONZÁLEZ A. J. (2000). *Ensayo in vitro de la eficacia de productos fitosanitarios frente a Rhizoctonia solani*. Actas de Horticultura. **28**: 129-133.
- GONZÁLEZ A.J., TELLO J.C., HERRERO M.L. (2004). *First report of Pythium tracheiphilum causing wilt and leaf blight on lettuce (Lactuca sativa) in Spain*. Plant Dis. **88** (12): 1382.
- LEROUX P., FRITZ R., GREDT M. (1977). *Etudes en laboratoire de souches de Botrytis cinerea Pers., résistantes à la dichlozoline, au dicloran, au quintozone, à la vinchlozoline et au 26019 RP (ou glycophane)*. Pytopath. **Z. 89**: 347-358.
- MARTÍN S. B., LUCAS L. T., CAMPBELL C. L. (1984). *Comparative sensitivity of Rhizoctonia solani and Rhizoctonia-like fungi to selected fungicides in vitro*. Phytopathology **74**: 778-781.
- MESSIAEN C.M., BLANCARD D., ROUXEL F., LAFON R. (1995). *Enfermedades de las hortalizas*. Ed. Mundi-Prensa.
- TAYLOR R. J., SALAS B., SECOR G. A., RIVERA V., GUDMESTAD N. C. (2002). *Sensitivity of North American isolates of Phytophthora erythroseptica and Pythium ultimum to melenoxam (metaxyl)*. Plant Dis. **86**: 797-802.