

# Sensibilidad de aislamientos nativos del hongo *R. solani* a fungicidas

Erika Paola Grijalba, Camilo Beltrán, Alba Marina Cotes

## Introducción

El control que generalmente se ha hecho contra el hongo fitopatógeno *R. solani* se fundamenta en prácticas culturales y en el manejo químico dado por los agricultores, en el cual se utilizan moléculas químicas pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, organofosforados, carboxi-anilidas y antibióticos pseudo-oligosacáridos, pertenecientes a categorías toxicológicas III y II, es decir moderada y altamente tóxicos. Estos productos son aplicados a la semilla en almacenamiento o durante la siembra, la emergencia y la deshierba del cultivo de la papa (Núñez, 2002); no obstante, su eficacia no siempre es satisfactoria, y depende de factores como la concentración y la sensibilidad del inóculo del hongo presente en el tubérculo o en el suelo.

Los plaguicidas comúnmente empleados en el cultivo de la papa contra *R. solani* representan riesgos para la salud humana si no se manejan adecuadamente, causando efectos agudos o crónicos, ya que muchos de estos son carcinogénicos y teratogénicos; además, pueden ocasionar problemas inmunológicos u hormonales (Liñán, 1997). Igualmente representan riesgos de contaminación ambiental, llegando a afectar ecosistemas completos, razón por la que es necesario hacer un uso racional de los mismos, en el que se eliminen sobredosis por usos ineficaces o sobreaplicaciones. Siguiendo este propósito, en el presente estudio se planteó evaluar la sensibilidad de los aislamientos de *R. solani*, Rh080, Rh176 y Rh200 con seis productos usados habitualmente por los agricultores para su control.

## Materiales y Métodos

### Fungicidas

Los productos evaluados fueron seleccionados a partir de un diagnóstico inicial realizado mediante encuestas a los agricultores en los municipios de Carmen de Carupa (Cundinamarca), Ventaquemada (Boyacá) y Santa Elena (Antioquia) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Fungicidas comúnmente utilizados por los agricultores en el manejo convencional de *R. solani*

Fungicida	Ingrediente activo (i.a)	Concentración del i.a. en el producto comercial	Dosis recomendada (ppm)
Derosal	Carbendazim	500 g/l	150
Benlate	Benomil	50 %	300
Rizolex	Tolclofos metil	750 g/kg	22.500
Vitavax	Carboxin+Captan	40 %	1.050
Validacín	Validamicina	30 g/l	300
Mertect	Tiabendazol	500 g/l	1.125

### Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio Agar Papa Dextrosa Saboureaud (PDS) inoculado con los fungicidas a evaluar, ajustando la concentración de estos en 25, 50, 100, 200 y 400 ppm. Los fungicidas se suspendieron inicialmente en agua estéril preparando una suspensión concentrada a partir de la cual se llevaron a cabo las diluciones necesarias para obtener la concentración requerida.

## Aislamientos de *R. solani*

Se evaluaron los aislamientos Rh080, Rh176 y Rh200 de *R. solani* del grupo de anastomosis AG3 obtenidos a partir de esclerocios sobre tubérculos de papa.

### Prueba de sensibilidad

Como unidad experimental se tomó una caja de Petri con el medio PDS y se colocó en el centro un círculo de agar de 5 mm de diámetro proveniente de un cultivo puro de *R. solani* de diez días de edad. Como parámetro de evaluación se tomó la inhibición del crecimiento micelial en condiciones *in vitro*; para esto, las cajas se incubaron a una temperatura de 25 °C y se midió el diámetro con un calibrador después de 3, 6, 9, 12 y 15 días de incubación.

### Diseño experimental y análisis de datos

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres réplicas por tratamiento. Se incluyó un testigo que consistió en el medio de cultivo sin fungicida, en el que se colocó un círculo de agar con *R. solani*.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de cada aislamiento se calculó mediante la siguiente fórmula, empleando los datos leídos el día 15:

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \left( \frac{a-b}{a-c} \right) * 100$$

Donde a = diámetro de la colonia en el testigo; b = diámetro de la colonia en el tratamiento con fungicida; y c = diámetro inicial de la colonia.

Con los resultados obtenidos se realizó una gráfica para cada producto evaluado, en la que se comparó su efecto sobre las tres cepas de *R. solani* y efectuó un ANAVA y comparación de medias de Tukey,  $\alpha = 0,05$  empleando el programa Statistics versión 4.0.

### Resultados y discusión

Los fungicidas Carbendazim (Derosal) y Validacin (Validamicina) presentaron un menor impacto sobre el crecimiento micelial de los tres aislamientos en comparación con Tiabendazol (Mertec), Benomil (Benlate), Tolclofos me-

til (Rizolex) y Carboxin-Captan (Vitavax), que presentaron un efecto mayor, en el que la inhibición fue superior al 90 % en todos los casos.

Con los productos Benomil (Benlate) y Tolclofos metil (Rizolex) se presentó una inhibición total del crecimiento radial (100 %) con las cinco dosis evaluadas, lo que indica que los tres aislamientos son sensibles a estos fungicidas. El Benomil es transformado en la célula fúngica en metilbencimidazolil carbamato (MBC) y posteriormente a un mononucleótido activo (Liñán, 1997). El MBC actúa interfiriendo en la síntesis de la tubulina durante la mitosis; además, afecta el ADN y la transcripción de mensajes genéticos de ADN a ARN (Liñán, 1997). Este producto está indicado para el tratamiento de *R. solani* en el cultivo de la papa pero únicamente en el tratamiento de la semilla, con una dosis recomendada de 200 g/Tonelada de papa (Diccionario Agropecuario, 2000), lo que equivale a 0,1 ppm.

En el presente estudio, con las concentraciones evaluadas en las pruebas *in vitro* (superiores a la recomendada) se inhibió el crecimiento de los tres aislamientos de *R. solani* con 25 ppm. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los resultados obtenidos por Meyer *et al.* en el año 2006, quienes evaluaron el efecto del Benomil sobre el crecimiento diametral del aislamiento *R. solani* AG1-IA, encontrando que a partir de una dosis de 10 ppm la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 %.

El producto Tolclofos metil actúa al producir la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y de la pared celular (Pesticides and environment, 2009). La dosis de Tolclofos metil recomendada para el manejo de *R. solani* en papa (5 a 7 Kg/Ha) se encuentra en un rango de 25.000 a 35.000 ppm, asperjando el producto en el momento de la siembra (Pro-Agro, 2009). En el presente estudio el crecimiento de los tres aislamientos de *R. solani* fue inhibido completamente con 25 ppm, lo que indica que los tres aislamientos de *R. solani* son sensibles a la acción de este fungicida. Kataria *et al.* (1991) evaluaron el efecto de Tolclofos metil sobre cinco aislamientos de *Rhizoctonia* mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, encontrando que en todos los casos este producto inhibió el crecimiento del hongo. Por su parte, Salazar (1999)

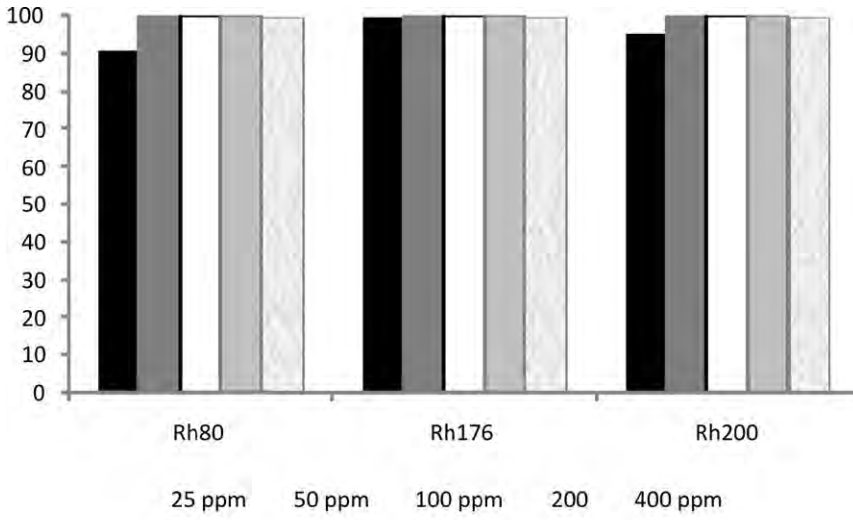
evaluó el efecto de diferentes fungicidas a la dosis recomendada sobre *R. solani* en el cultivo de arroz, notando que los fungicidas evaluados –dentro de los cuales se encontraba Benomil y Tolclofos metil– redujeron significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad, y que al aplicar estos agroquímicos se obtuvo el mayor rendimiento en el cultivo.

El fungicida Tiabendazol (Mertec) (Figura 11A) pertenece al grupo de los bencimidazoles y actúa inhibiendo la síntesis de la tubulina en la mitosis (Liñán, 1997). Este producto no está indicado para el control de *R. solani* en el cultivo de la papa sino únicamente en el cultivo del arroz a una dosis recomendada de 4.000 ppm, lo que equivale a 4 gramos por litro (Vademécum Florícola, 2002); sin embargo, los agricultores también lo utilizan para el control de *R. solani* en papa, razón por la que se evaluó en el presente estudio.

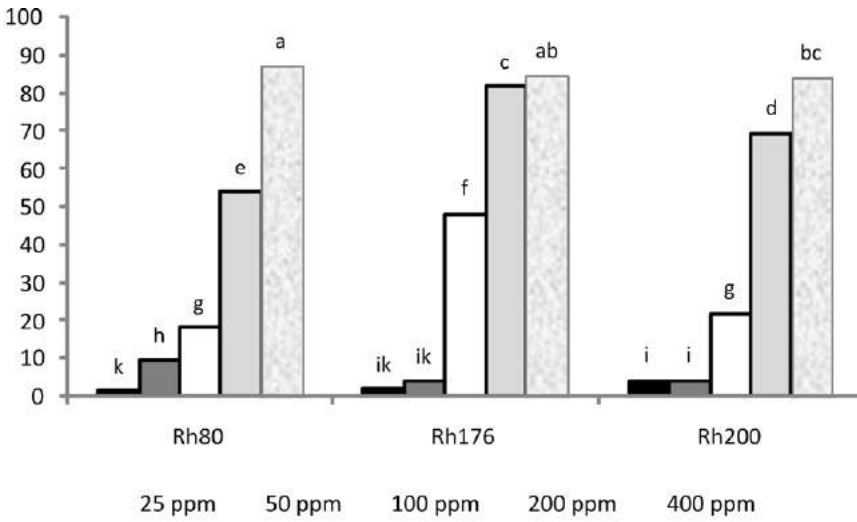
El porcentaje de inhibición en el crecimiento diametral para los tres aislamientos (Rh080, Rh176 y Rh200) con la dosis de 25 ppm de Tiabendazol se encontró entre el 90 % al 100 %, resultados que no fueron significativamente diferentes a los encontrados con las demás dosis evaluadas, en las que la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 % (lo que indica que las tres cepas son sensibles a la acción de este fungicida bajo condiciones *in vitro*). Resultados similares fueron obtenidos por Meyer *et al.* (2006), quienes encontraron una inhibición en el crecimiento de *R. solani* AG1-I del 100 % cuando se empleó una dosis entre 10 ppm y 100 ppm de este fungicida.

Aunque la dosis recomendada en el cultivo del arroz es diez veces mayor a la máxima dosis evaluada en este estudio, y con esta última la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 %, es necesario evaluar *in vivo* la dosis a emplear en el cultivo de la papa con el fin de evitar que surjan posibles problemas de pérdida de sensibilidad de *R. solani* a este fungicida, más si se tiene en cuenta que en el 2008 la FRAC (Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas) lo catalogó como un producto con un alto riesgo para que diversas especies de hongos desarrollen resistencia, pues se conocen diferentes puntos del gen de la  $\beta$ -tubulina en los que se han producido mutaciones, impidiendo así la acción de los bencimidazoles (FRAC, 2008).

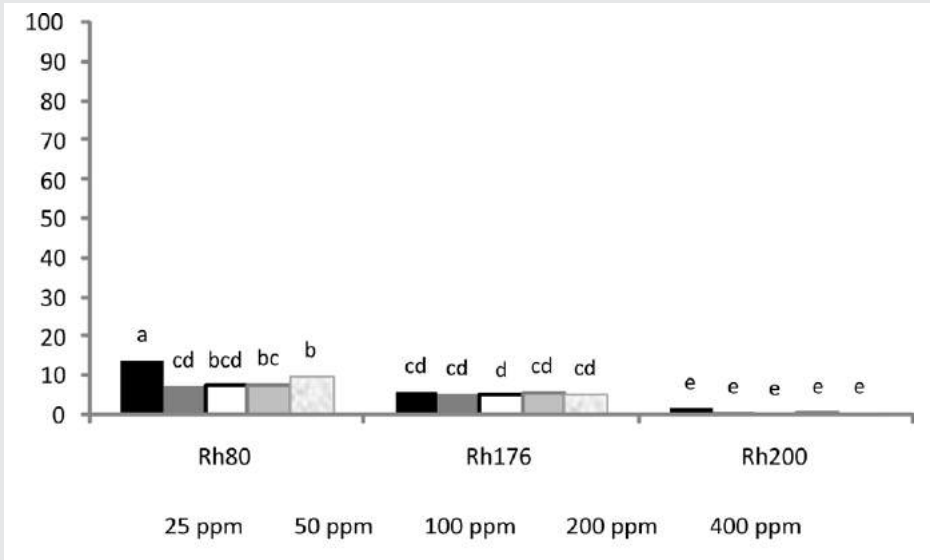
A)



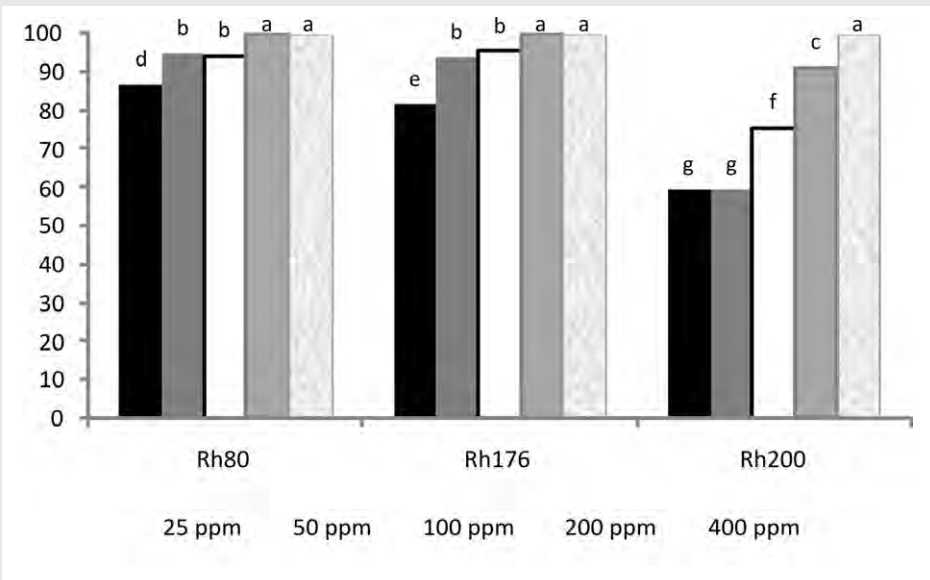
B)



C)



D)



**Figura 11.** Sensibilidad de los aislamientos Rh80, Rh176 y Rh200 a agroquímicos. A) Tiabendazol; B) Validacin; C) Carbendazim; D) Carboxin-Captan. Las columnas con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey,  $\alpha = 0,05$ .

Validamicina (Validacin) es un antibiótico no sistémico que presenta actividad fungicida. Consiste en una mezcla de seis estructuras diferentes, designadas de la A a la F, siendo Validamicina A el componente más importante y eficaz (Liñán, 1997). Este producto impide la descomposición de la trehalosa reduciendo la producción de glucosa, vital en el proceso de respiración y generación de energía en las células del patógeno (Fede-arroz, 2007). El antibiótico se recomienda para el control de *R. solani* en arroz y papa (Vademécum Florícola, 2002). Cuando se evaluó en este estudio una concentración de 25 ppm y 50 ppm, la inhibición en el crecimiento diametral fue inferior al 10 % para las tres cepas; con la concentración de 100 ppm y 200 ppm la cepa Rh176 fue significativamente más sensible, en comparación con Rh080 y Rh200. Con la máxima dosis evaluada (400 ppm) las tres cepas presentaron un rango de inhibición del crecimiento diametral de entre el 84 % y el 88 %, siendo el aislamiento Rh80 particularmente menos sensible en comparación con la cepa Rh200 (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que el efecto de la Validamicina sobre el crecimiento diametral de los tres aislamientos depende de la concentración evaluada; así mismo, teniendo en cuenta que la dosis recomendada para el producto en papa es de 300 ppm –lo que corresponde al rango evaluado entre 200 ppm y 400 ppm– se puede observar que el aislamiento Rh80 presenta menor sensibilidad al producto evaluado.

El fungicida Carbendazim (Derosal) pertenece al grupo de los bencimidazoles e interfiere con la biosíntesis de ADN durante la mitosis y la transcripción de mensajes genéticos de ADN a ARN. Impide el desarrollo de las hifas, la formación de apresorios y el crecimiento del micelio. Permite la germinación de las esporas, aunque detiene el desarrollo del tubo germinativo provocando irregularidades en la división celular, dando lugar a células anormales que provocan la muerte del hongo (Liñán, 1997). Sin embargo, este fungicida está indicado para el control de *R. solani* en el macollamiento del cultivo de arroz, pero no en el cultivo de la papa (Diccionario Agropecuario, 2000). En este estudio la inhibición en el crecimiento diametral para las tres cepas

con las cinco concentraciones evaluadas fue inferior al 15 %. Igualmente, los resultados de inhibición obtenidos para el aislamiento Rh200 con las cinco concentraciones evaluadas fueron significativamente menores en comparación con los resultados obtenidos para los aislamientos Rh80 y Rh176, lo que sugiere que aunque las tres cepas presentan poca sensibilidad a Carbendazim, la cepa Rh200 es significativamente menos sensible a este fungicida. Los resultados obtenidos aquí difieren de los resultados reportados por Meyer *et al.* (2006), quienes observaron que con una dosis de 10 ppm se inhibió el 100 % del crecimiento diametral del hongo.

En cuanto al fungicida Carboxin-Captan (Vitavax), la molécula de Carboxin inhibe la enzima succinato-dehidrogenasa afectando la respiración celular, y la molécula de Captan tiene múltiples sitios de acción (FRAC, 2008). Con este producto se observó como tendencia que a medida que aumentó la dosis se incrementó el porcentaje de inhibición del crecimiento diametral. Para los aislamientos Rh80 y Rh176 la inhibición en el crecimiento diametral se encuentra entre el 81 % al 100 %, en donde se detectaron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ( $P < 0,05$ ). Por su parte, para el aislamiento Rh200 la inhibición en el crecimiento diametral se encuentra entre el 59 % al 100 %.

Con las concentraciones correspondientes a 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm, el aislamiento Rh200 presentó valores de inhibición representativamente menores en comparación con los aislamientos Rh80 y Rh176. Estos resultados indican que la cepa Rh200 mostró menor sensibilidad a este fungicida en balance con los aislamientos Rh80 y Rh176. No obstante, con la concentración de 400 ppm la inhibición en el crecimiento diametral fue del 100 % para las tres cepas. Este fungicida está indicado para el control de *R. solani* en papa y arroz (Diccionario Agropecuario, 2000); en el primero, con una dosis recomendada de 2.000 ppm, casi cinco veces mayor a la dosis evaluada que presentó una inhibición en el crecimiento diametral del 100 %. De acuerdo con la FRAC (2008), los fungicidas que tienen este mecanismo de acción presentan un menor riesgo en el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos.

Generalmente cuando un patógeno desarrolla una menor sensibilidad a un fungicida, automática y simultáneamente llega a ser menos sensible a otros fungicidas que tienen el mismo mecanismo de acción y pertenecen al mismo grupo químico (Brent y Hollomon, 2007). Con todo, a partir de los resultados obtenidos para el grupo de los benzimidazoles los aislamientos evaluados presentaron mayor sensibilidad a Benomil y a Tiabendazol en comparación con el Carbendazim, lo que se conoce como 'resistencia cruzada parcial' cuando se estudian poblaciones de patógenos que son sensibles solo a algunos productos de un grupo químico (Brent y Hollomon, 2007). La resistencia a los benzimidazoles se ha evidenciado en diferentes especies de hongos, existiendo diferentes sitios blanco de mutaciones, principalmente en el gen de la  $\beta$ -tubulina (FRAC, 2008), lo que posiblemente explica la sensibilidad de Rh80, Rh176 y Rh200 a Benomil y a Tiabendazol.

Debido al uso indiscriminado de los productos químicos en la agricultura, los microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa ante diferentes moléculas que buscan inhibir procesos metabólicos o interferir con funciones vitales para controlarlos; ejemplo de esto es la inactivación de dichas moléculas por enzimas, alteraciones en la molécula receptora del microorganismo para reducir la afinidad por la molécula del producto químico, mecanismos de reparación del ADN que es afectado por acción de los fungicidas y bombas de flujo para expulsar de la célula sustancias tóxicas, entre otros (Kolaczkowski y Goffeau, 1997), procesos que llevan al desarrollo de resistencia de poblaciones de patógenos.

Aun cuando el presente estudio no evaluó el desarrollo de resistencia, es necesario tener en cuenta que la baja sensibilidad de un patógeno a un producto bajo condiciones controladas es una señal de alarma de un posible desarrollo de resistencia (Brent y Hollomon, 2007), lo que en este caso se evidenció con el Carbendazim y con el Validacin a una dosis inferior a 400 ppm. Se hace entonces preciso utilizar solamente las dosis recomendadas por el fabricante, desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas, rotar el empleo de los productos que han demostrado eficacia en el control del fitopatógeno para reducir el riesgo de desarrollo de mecanismos de

defensa ante los productos empleados para su control y evitar el uso de productos deteriorados.

## Conclusiones

1. Las cepas de *R. solani* Rh80, Rh176 y Rh200, fueron sensibles a las cinco dosis evaluadas de Benlate, Tolclofos metil y Tiabendazol ya que presentaron una inhibición del crecimiento diametral entre el 90% al 100%.
2. Los aislamientos de *R. solani* presentaron una menor sensibilidad a las cinco dosis evaluadas del fungicida Carbendazim, evidenciada por una menor inhibición en el crecimiento diametral.
3. La sensibilidad de los aislamientos de *R. solani* frente al fungicida Validamicina estuvo relacionada directamente con la dosis evaluada, donde a mayor dosis mayor fue la inhibición del crecimiento del hongo.
4. Con los fungicidas Carbendazim y Carboxín-Captan la sensibilidad de la cepa Rh200 fue menor en comparación con los aislamientos Rh80 y Rh176.

## Bibliografía

- Brent, K.; Hollomon, D. (2007). Fungicide resistance in crops pathogens: How can it be managed? Segunda edición. CropLife International, Fungicide Resistance Action Committee. p. 60.
- Diccionario Agropecuario. (2001 – 2002). Vademécum de productos agropecuarios. Año XV. Edición 13. Ediciones HC Ltda.
- Fedearroz - Federación nacional de productores de arroz. (2007). Lista de insumos fungicidas-Validacin. [www.fedearroz.com.co](http://www.fedearroz.com.co)
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). (2008). Code List©\*: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Versión consultada en diciembre de 2009. [www.frac.info.com](http://www.frac.info.com).
- Kataria, H. R.; Hugelshofer, U.; Gisi, U. (1991). Sensivity of *Rhizoctonia* species to different fungicides. *Plant Pathology* (40): 203 – 211.
- Kolaczowski, M.; Goffeau, A. (1997). Active efflux by multidrug transporters as one of the strategies to evade chemotherapy and novel practical implications of yeast pleiotropic drug resistance. *Pharmacology Therapeutics* (76): 219-242.

- Liñán, C. (1997). Farmacología vegetal. Compendio de las sustancias activas, insectos y ácaros utilizados en la prevención y control de plagas, enfermedades y plantas no deseadas, así como en la regulación de la fisiología de los vegetales cultivados. España.
- Meyer, M.; Bueno, C.; Souza, N.; Yorinon, J. (2006). Effect of doses of fungicides and lant resistance activators on the control of *Rhizoctonia* foliar blight of soybean and on *Rhizoctonia solani* AG1-IA in vitro development. *Crop Protection* (25): 848-854.
- Ñústez, C. (2002). Efecto de diferentes niveles de inóculo de *Rhizoctonia solani* en semilla y dos sistemas de manejo, sobre el rendimiento y sanidad del tubérculo cosechado. Informe Técnico. Convenio 094 de 2000. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, y Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT. CORPOICA.
- Pesticides and environment. Blog: 2009. Versión consultada en diciembre de 2009. [www.dropdata.org](http://www.dropdata.org).
- PRO-AGRO. (2009). Versión consultada en junio de 2010. <http://www.proagro.com.mx/prods/valent/valent19.htm>.
- Salazar, J. (1999). Evaluación de fungicidas en el control de *Rhizoctonia solani* en arroz. Resumen 63. XI Congreso Nacional Agronómico/ IV Congreso Nacional de Fitopatología. p. 65.
- Vademécum Florícola. 2002. Edifarm. La Imprenta Editores. Colombia.